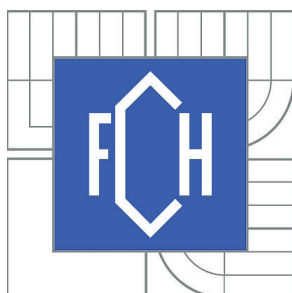


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ ŘASOVÝCH TESTŮ V EKOTOXIKOLOGII

THE USE OF ALGAL TEST IN ECOTOXICOLOGY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TEREZA HÁJKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**Mgr. HELENA DOLEŽALOVÁ
WEISSMANNOVÁ, Ph.D.**

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0361/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Tereza Hájková	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Využití řasových testů v ekotoxikologii

Zadání diplomové práce:

Práce bude využívat řasové testy pro hodnocení ekotoxicity vybraných chemických sloučenin.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Tereza Hájková
Student(ka)

Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.
Vedoucí práce

Doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá využitím řasových testů v ekotoxikologii. Pro posouzení ekotoxicity vybraných chemických látek byla použita sladkovodní řasa *Desmodesmus subspicatus*. Pro vyhodnocování E_rC_{50} byla využita metoda spektrofotometrie ve VIS oblasti. Za tímto účelem byla zjištěna vzájemná korelace mezi počtem řasových buněk a absorpance při vlnové délce 683 nm. Testovány byly tyto chemické látky: kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová, kyselina (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová a N-(4-hydroxyphenyl)acetamid. Pro všechny tyto látky byla určena hodnota E_rC_{50} a vyhodnocena jejich ekotoxicita.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with a use of algal test in ecotoxicology. A freshwater algae, *Desmodesmus subspicatus*, was used to asses the ecotoxicity of selected chemical substances. A spectrophotometry method, of VIS spectrum, was used in evaluation of the E_rC_{50} . A correlation, between a number of algal cells and the wavelength absorbance at 683 nm, has been determined for this purpose. Following chemicals were tested, 2-[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid, (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid and N-(4-hydroxyphenyl)acetamide. An E_rC_{50} value was determined for all these substances and also their ecotoxicity has been evaluated.

KLÍČOVÁ SLOVA

řasové testy, testy ekotoxicity, ekotoxikologie, ekotoxicita, EC_{50}

KEYWORDS

algal tests, tests of ecotoxicity, ecotoxicology, ecotoxicity, EC_{50}

HÁJKOVÁ, T. *Využití řasových testů v ekotoxikologii*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 61 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí práce Mgr. Heleně Doležalové Weissmannové, Ph.D., za odborné a vstřícné vedení diplomové práce a za její věcné a užitečné rady a připomínky.

Ráda bych také poděkovala svým rodičům, za to že mi umožnili studovat, a především pak mamince za její bezmeznou podporu.

OBSAH

1. Úvod	5
2. Teoretická část	6
2.1 Ekotoxikologie	6
2.2 Biologické testy toxicity	6
2.3 Základní rozdělení ekotoxikologických testů	7
2.3.1 Podle doby expozice	7
2.3.2 Podle pokročilosti designu testovacího systému	8
2.3.3 Podle úrovně biologické organizace	9
2.3.4 Podle testovaného organismu	9
2.4 Řasy a jejich význam v ekotoxikologii	12
2.4.1 Charakteristika řas	12
2.4.2 Systematika řas	12
2.5 Řasové testy	14
2.5.1 Rozdělení řasových testů podle typu řas	14
2.5.2 Význam řasových testů	14
2.5.3 Princip standardního řasového testu	15
2.5.4 Provedení standardního řasového testu	15
2.5.5 Volba koncentračních řad	16
2.5.6 Zkušební organismy	17
2.5.7 Použitelnost zkušební metody	18
2.5.8 Faktory ovlivňující průběh řasového testu	19
2.5.9 Vyhodnocování řasového testu	21
2.5.10 Validita zkoušky	23
2.5.11 Využití řasových testů	23
2.6 Legislativa	24
3. Experimentální část	26
3.1 Přístroje a pomůcky	26
3.1.1 Zkušební nádoby	26
3.1.2 Binokulární mikroskop L1100B SM 5 A	26
3.1.3 Počítací komůrky	27
3.1.4 Spektrofotometr HACH DR/4000 U	28
3.2 Metodika	29
3.2.1 Kultivace zásobní kultury	29
3.2.2 Stanovení počtu buněk řas	30
3.2.3 Stanovení korelační křivky	31

3.2.4	Řasové testy se standardními testovacími látkami	32
3.2.5	Řasové testy s vybranými chemickými látkami	35
4.	Výsledky a diskuse	40
4.1	Stanovení počtu buněk řas	40
4.2	Korelace	40
4.2.1	Stanovení počtu buněk řas v jednotlivých koncentracích	40
4.3	Řasový test se standardní testovací látkou $K_2Cr_2O_7$	41
4.3.1	Objem řasového inokula	41
4.3.2	Vyhodnocení	42
4.4	Řasový test se standardní testovací látkou 3,5-dichlorfenol	44
4.4.1	Objem řasového inokula	44
4.4.2	Těkavost 3,5-dichlorfenolu (test)	44
4.4.3	Vyhodnocení	45
4.5	Test s kyselinou 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octovou	47
4.5.1	Objem řasového inokula	47
4.5.2	Vyhodnocení	47
4.6	Test s kyselinou (<i>RS</i>)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionovou	49
4.6.1	Objem řasového inokula	49
4.6.2	Vyhodnocení	49
4.7	Test s N-(4-hydroxyphenyl)acetamidem	51
4.7.1	Objem řasového inokula	51
4.7.2	Vyhodnocení	51
5.	Závěr	53
	Seznam použitých zdrojů	54
	Seznam použitých zkratk a symbolů	58

1. ÚVOD

V současné době jsou každoročně vyprodukována velká množství nových chemických látek a přípravků o neznámých vlivech na živé organismy a další látky jsou svévolně nebo lidskou nedbalostí vypouštěny do životního prostředí. Celosvětově narůstají problémy se znečišťováním všech složek životního prostředí. Abychom mohli odstranit některé následky naší neukázněné činnosti, musíme nejdříve identifikovat nebezpečné látky, jejich producenty a co je nejdůležitější, je nutné zjistit, jak dalece poškozují živý organismus a ekosystémy. K tomuto účelu slouží testy ekotoxicity.

Stanovení akutní a chronické toxicity neznámých látek, např. výluhů z průmyslových odpadů nebo ze skládek, odpadních vod určených pro další užití, slouží k určení toxického vlivu látek na akvatické a terestrické organismy. Zatímco testy chronické toxicity se používají k určení negativních účinků látek při jejich dlouhodobém působení na organismy. Akutní testy toxicity slouží k určení okamžitého účinku látek, který vyvolává úhyn organismů, v mírnějším případě jejich stresové chování. Výsledkem ekotoxikologických testů je určení efektivní koncentrace testované látky EC_{50} , při které dochází k úhynu nebo imobilizaci 50 % organismů. Podle této hodnoty lze testovanou látku zařadit do tříd toxicity a odhadnout míru jejího škodlivého působení na vodní organismy.

K testování ekotoxicity slouží několik druhů organismů, pro akvatické ekotesty se používají zejména drobní vodní koryši (*Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*) a dále pak zelené řasy, které jsou zástupci producentů ve vodním ekosystému. Mezi nejčastěji používané řasy patří *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je vědní obor, který se svou specializací vyčlenil přibližně před 20 lety. Jedná se o multidisciplinární předmět zabývající se oblastí tvořenou průsečíkem chemie životního prostředí, toxikologie, ochrany životního prostředí a ekologie. Zmíněné obory dále rozvíjejí v aplikacích jejich metodologie na celý ekosystém. Centrálním tématem je studium působení, mechanismů a následků antropogenních xenobiotik na ekosystém, včetně člověka samého. Vlastním výstupem jsou informace sloužící k predikci chování a minimalizaci negativních následků působení xenobiotik, k ochraně ekosystému a k prevenci a hodnocení rizik spojených s užíváním chemikálií. Získané informace jsou využívány v zákonných regulačně-bezpečnostních normách. [45]

Cílem oboru je tedy vyvíjet metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv chemických látek na živé organismy za standardních reprodukovatelných podmínek. Metody musejí umožnit srovnání účinků různých látek mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří. [19]

Chemickou látkou rozumíme chemické prvky a sloučeniny těchto prvků definovaného složení, příp. jejich směsi. Chemická škodlivina (noxa) je taková chemická látka, která je schopná zapříčinit poškození zdraví, tj. vyvolat onemocnění nebo odchylku od normálního stavu, kterou lze odhalit v průběhu styku se škodlivinou, v návaznosti na něm, v pozdějších obdobích života, eventuálně u budoucích generací.

Z hlediska toxikologie a ekotoxikologie můžeme každou látku považovat za potenciálně nebezpečnou, protože každá může za určitých okolností působit nepříznivě, v závislosti na velikosti dávky vyvolávající účinek a trvání expozice. Expozice je chápána jako vystavení živého organismu působení chemické látky, při níž dojde k jejímu průniku do vnitřních částí organismu. [9, 30, 33]

Základní charakteristikou (nebezpečnou vlastností) chemických látek, přípravků, včetně pesticidních, a odpadů je ekotoxicitu. Potvrzení nebo vyloučení ekotoxicity se děje na základě biotestů (ekotoxikologický biotest). Testy slouží ke zjištění či odhadu možného toxického vlivu testovaných látek na živé organismy. V testech se pro stanovení sledovaného jevu využívají detekční systémy (organismy, tkáně apod.), které jsou relevantní (umožňují interpretaci, mají dostatečnou výpovědní hodnotu apod.) pro sledované ekosystémy či matrice (vodní prostředí, půdní prostředí, chemické látky, odpady apod.). [46]

2.2 Biologické testy toxicity

Ačkoliv chemické analýzy látek, přípravků, odpadních vod, atmosférických srážek, výluhů a splachů poskytují důležité informace o jejich nebezpečných vlastnostech, nemohou dostatečně poskytnout údaje o toxicitě jednotlivých látek, zejména pokud jde o jejich směsi. Za tímto účelem je nutno použít biologické metody hodnocení, tzv. biologické testy toxicity, neboli biotesty, popř. bioassays. [18]

Biotest je definován jako zkouška, která stanoví množství nebo koncentraci látky v prostředí pomocí reakcí živého organismu. V širším pojetí se jedná o stanovení biologického účinku nějaké látky nebo faktoru prostředí. Protože v přírodě působí faktory komplexně, volí se pre-

ferenčně metody laboratorní. Laboratorní testy používají jediný druh, který je vystaven změně jediného faktoru za časový interval v kontrolovaných podmínkách. [26]

Výhodou biologických testů je schopnost vypovídat o vlivu znečištění v celém jeho komplexu, se všemi aditivními, synergistickými a antagonistickými vlivy mezi jednotlivými znečišťujícími komponenty. Význam biologických testů hodnocení ekotoxicity je hlavně v tom, že postihují souhrn účinků všech přítomných komponent a současně také látek, které nebyly chemickými analýzami prokázány, v testovaném roztoku na testovaný materiál, kterým může být organismus, kultura, tkáň nebo buňka. Hlavním cílem testů na biologickém materiálu je stanovit hraniční koncentrace, ve kterých je možný život testovaných organismů. Testy prováděné na vodních organismech jsou vhodné pro hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů ze skládky, havárií průniku odpadních vod do povrchových či podzemních vod apod. [18]

2.3 Základní rozdělení ekotoxikologických testů

2.3.1 Podle doby expozice

Podle doby trvání expozice dělíme testy na akutní, subakutní (subchronické) a chronické.

A) *Akutní testy*

Patří mezi nejrozšířenější standardní laboratorní testy. Délka trvání testů je 24 až 96 hodin. Sledují se jimi účinky, které se projeví v krátké době po jednorázovém podání látky. Nejčastěji se stanovuje mortalita měřená jako LD₅₀ nebo LC₅₀, popř. inhibice IC₅₀ a udává se v mg/l. Podle těchto hodnot lze testovanou látku zařadit do tříd toxicity a odhadnout míru jejího škodlivého působení na organismy. Akutní toxicita však udává pouze relativní toxicitu testované látky.

B) *Subakutní (subchronické) testy*

Tyto testy trvají obvykle 28 až 90 dnů. Organismy jsou opakovaně, obvykle jednou denně, exponovány testované látkou. Provádí se paralelní test s kontrolní skupinou, s níž musí být zacházeno stejným způsobem jako s exponovanou, kromě podávání zkoumané látky. Tímto se separují vlivy prostředí od působení dané látky. Tyto testy slouží ke studiu nejvýznamnějších toxických změn při opakované expozici dané látky a k získání hodnot NOEC a LOEC, nemusí však odhalit následky dlouhodobého působení. Výsledky subchronických testů jsou velmi užitečné pro účelné navržení chronického testu.

C) *Chronické testy*

Při chronických testech jsou organismy exponovány testované látkou dlouhou dobu, často po celou dobu dospělého života. V daných pravidelných intervalech se testovaným organismům podává testovaná látka a v průběhu experimentu jsou sledovány jednotlivé patologické změny pomocí vhodně zvolených parametrů, které indikují škodlivý účinek. Kontrolní skupina musí být stejně početná jako skupiny exponované a musí být držena za stejných podmínek, jen s tím rozdílem, že zůstává neexponována sledované látkou. Chronické testy slouží k získání informací o dlouhodobém působení látky na živý organismus a pro určení hodnot NOEC a LOEC. [19, 29, 40]

2.3.2 Podle pokročilosti designu testovacího systému

Pro monitoring životního prostředí jsou využívány tři generace testů.

A) Testy 1. generace

První generace testů je představována klasickými, standardními a konvenčními metodami, které jsou založené na akutních testech na v laboratoři chovaných organismech a udržovaných kulturách. [1]

V rámci testování ekologické vhodnosti se používají čtyři konvenční testy doporučené českou legislativou.

- 96hodinový akutní test toxicity na rybách *Poecilia reticulata*, *Brachydanio rerio* (ČSN EN ISO 7346-2);
- 48hodinový imobilizační test na dafniích *Daphnia magna* (ČSN EN ISO 6341);
- 72hodinový růstově inhibiční test na řasách *Desmodesmus subspicatus*, *Desmodesmus quadricauda* (ČSN EN ISO 8692);
- 72hodinový test klíčivosti a růstu kořene hořčice *Sinapis alba* (dle věstníku MŽP 4/2007).

Tyto biotesty mají velkou výhodu, neboť jsou zakotveny v české legislativě. Provedení těchto testů je však ekonomicky a časově velice náročné. Kultury živých testovacích organismů se musí dlouhodobě udržovat a krmit. Samotné testování zabírá mnoho laboratorního prostoru (akvária), času (48–96hodinové testování), materiálu (velké množství laboratorního skla) a vzorku (2–5 litrů). Proto je další generace biotestů výhodnou alternativou ke klasickým. [24]

B) Testy 2. generace (mikrobiotesty)

Druhá generace testů toxicity se začíná v současné době stále více používat a je představována alternativními biotesty, známými pod názvem mikrobiotesty [1]. Zvýšená potřeba testovat stále nové chemické látky a více vzorků životního prostředí vedla k následujícím trendům ve vývoji biotestů:

- miniaturizaci;
- zkrácení doby inkubace;
- zlevnění biotestů;
- zapojení biotestů reprezentující různé trofické úrovně v ekosystému;
- využití nových vědeckých poznatků (např. řízení produkce klidových stádií, uchování řasových kultur).

Testovací organismy využívané v mikrobiotestech mohou představovat bakterie, prvoci, řasy, bezobratlí, rybí tkáňové kultury aj. Tyto organismy se dlouhodobě uchovávají v klidových stádiích (bezobratlí), lyofilizovaném stavu (bakterie) nebo imobilizované formě (řasy) a je možné je oživit před vlastním testováním. Mikrobiotest je miniaturizovaný biotest, proto se jako testovací nádoby používají zkumavky, kyvety, mikrotitrační destičky atd. Doba testu je také zkrácená a to na několik hodin až minut namísto dnů.

C) Testy 3. generace (biosenzory a biosondy)

Třetí generací testů jsou biosenzory a biosondy, které se stále testují a jejich uplatnění se očekává zejména v on-line monitorovacích systémech a screeningových testech toxicity.

Příkladem biosenzoru může být biosenzor s imobilizovanými řasami pro testy toxicity, kde jako biosenzor je použito jakékoli již běžně používané řasy, např. chlorokokální *Desmodesmus subspicatus*. Tato řasa je imobilizována do agaru a tento biosenzor je přelit testovaným vzorkem, nasyceným CO₂ a je exponován na světle. Vzrůst pH je důkazem probíhající fotosyntézy a měřítkem nezávadnosti. Celý test je možné provést i v terénu. [18, 24]

2.3.3 Podle úrovně biologické organizace

Testy toxicity se provádějí na třech úrovních, a to na úrovni buněk a tkání, na úrovni jedinců (organismů) a na úrovni společenstev (biocenóz).

A) Testy na úrovni buněk a tkání

Testy na buněčných kulturách jsou dosud využívány zejména pro teoretické objasnění účinku toxického agens. V poslední době se však začínají tkáňové kultury využívat i pro rutinní provádění testů toxicity. Jejich výhodou je vysoká citlivost a reprodukovatelnost a nízké a zejména časové nároky. Nevýhodou je skutečnost, že systémy in vitro nemohou suplovat enzymaticko-imunitní systém živého organismu, a tudíž je výsledek testu toxicity poplatný použité buněčné linii, příp. zdrojovému orgánu či tkáni. Přesto se testy toxicity na buněčných kulturách jeví jako vhodný screening před provedením baterie testů na živých organismech.

B) Testy na úrovni jedinců (organismů)

V současnosti jsou nejvíce používány testy na úrovni organismů, ačkoliv stále přetrvávají určité potíže s reprodukovatelností. Tyto testy se využívají při hodnocení akutní, příp. chronické toxicity látek. Výběr organismů k testům toxicity je prováděn tak, aby byly postiženy jednotlivé trofické úrovně ve vodním prostředí. To znamená prakticky čtyři úrovně – bakterie, řasy, planktonní (bentické) organismy a ryby. Odpověď jednotlivých organismů na přítomnost toxických látek není jednotná, ovlivňuje ji mnoho faktorů, jako je dosažitelnost toxikantu, způsob přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulace nebo schopnost polutant odbourávat atd. Proto by se při ekotoxikologickém monitoringu neměly nikdy dělat závěry z testování pouze na jednom organismu. Zapojením většího počtu testovacích organismů roste informace o zkoumaném vzorku a zvyšuje se tak výpovědní hodnota celé metody. Do baterie jsou pak vybírány individuální testy tak, aby byla schopna detekovat co nejvíce skupin toxikantů s vysokou spolehlivostí.

C) Testy na úrovni společenstev (biocenóz)

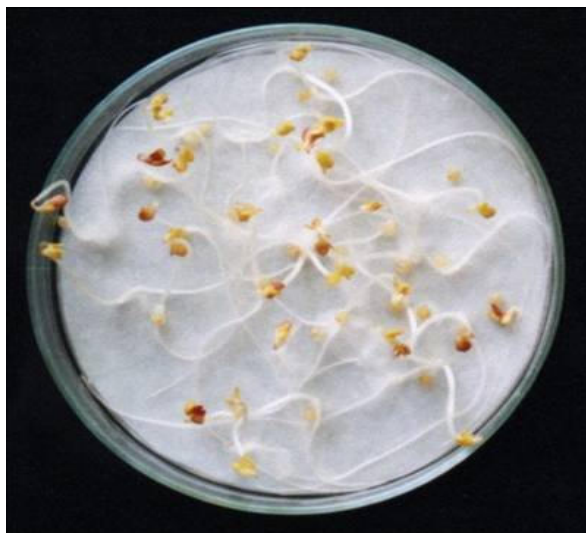
Na úrovni biocenóz se sleduje toxický účinek v přírodě či na modelu, nevýhodou je fakt, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně, různé reakce na určitý druh, narušení potravních řetězců. [1, 2, 18, 24, 44]

2.3.4 Podle testovaného organismu

A) Terestrické

■ Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Test byl vyvinut k testování účinků odpadních vod využívaných pro závlahy. Při této zkoušce se využívá citlivosti klíčících semen hořčice bílé *Sinapis alba* v počátečních stádiích vývoje rostliny na jedovaté látky. [1]



Obr. 1: Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (zdroj: www.vustah.cz)

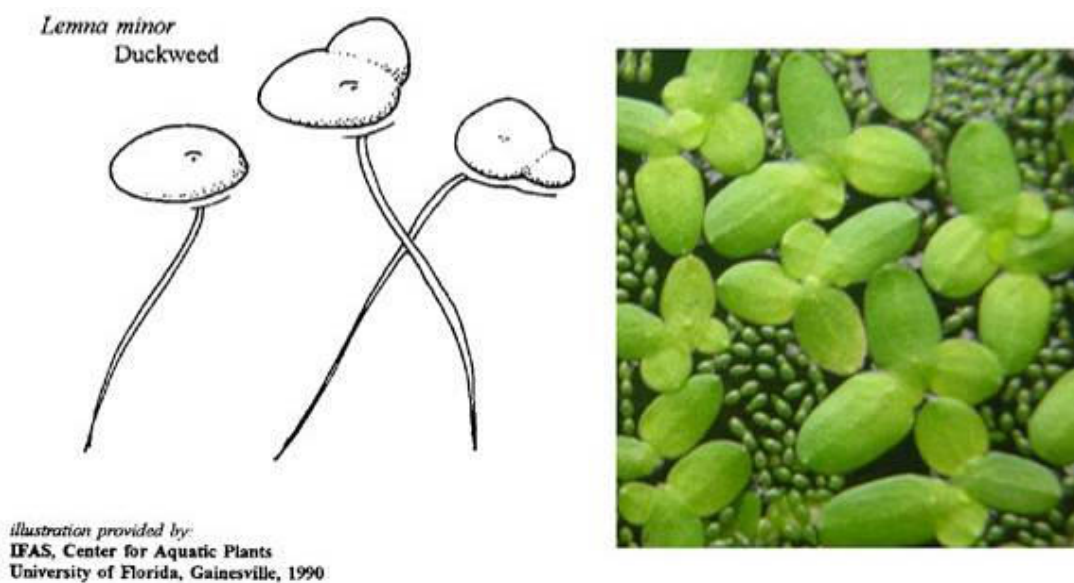
- Test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské *Allium cepa*
Cílem je stanovení inhibičního účinku zkoušené látky na růst kořene cibule kuchyňské v počátečních stádiích vývoje rostliny. [1]



Obr. 2: *Allium cepa* (zdroj: toads.wordpress.com)

B) Akvatické

- Test toxicity na okřehku menším *Lemna minor*
Cílem testu je stanovení akutní toxicity na vegetativní růst sladkovodní rostliny okřehku menšího *Lemna minor*. [1]



Obr. 3: *Lemna minor* (zdroj: keys.lucidcentral.org)

■ Test toxicity na korýši *Daphnia magna*

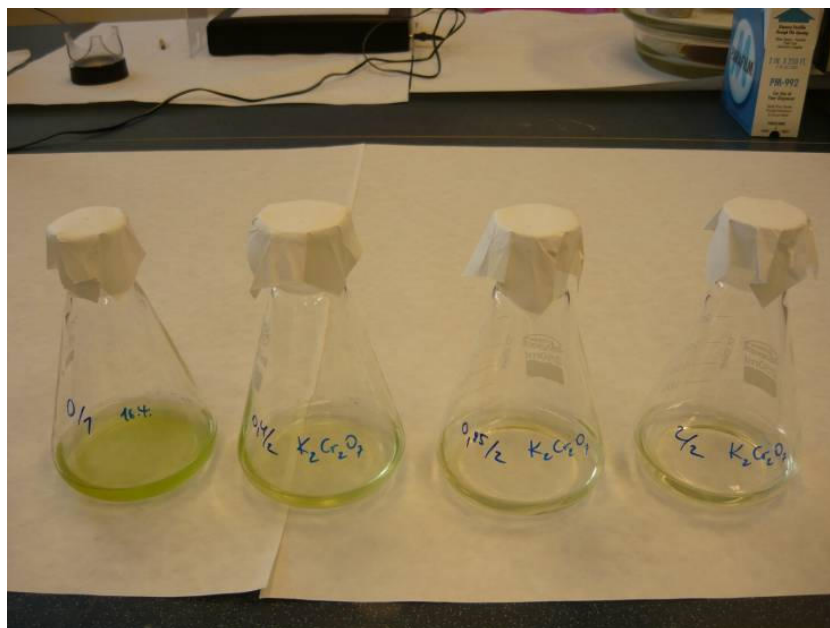
Metoda je standardizována normou ČSN EN ISO 6341. Cílem testu je zjištění vlivu vodou vyluhovatelných látek na mortalitu a imobilizaci drobného korýše *Daphnia magna* STRAUS. [1]



Obr. 4: *Daphnia magna* STRAUS (zdroj: www.vustah.cz)

■ Zkouška toxicity na chlorokokální řase *Desmodesmus subspicatus*

Cílem testu je stanovení toxického účinku vodou vyluhovatelné látky na inhibici růstu a rozmnožování chlorokokální řasy *Desmodesmus subspicatus*. [1]



Obr. 5: Test inhibice růstu chlorokokální řasy *Desmodesmus subspicatus*

2.4 Řasy a jejich význam v ekotoxikologii

2.4.1 Charakteristika řas

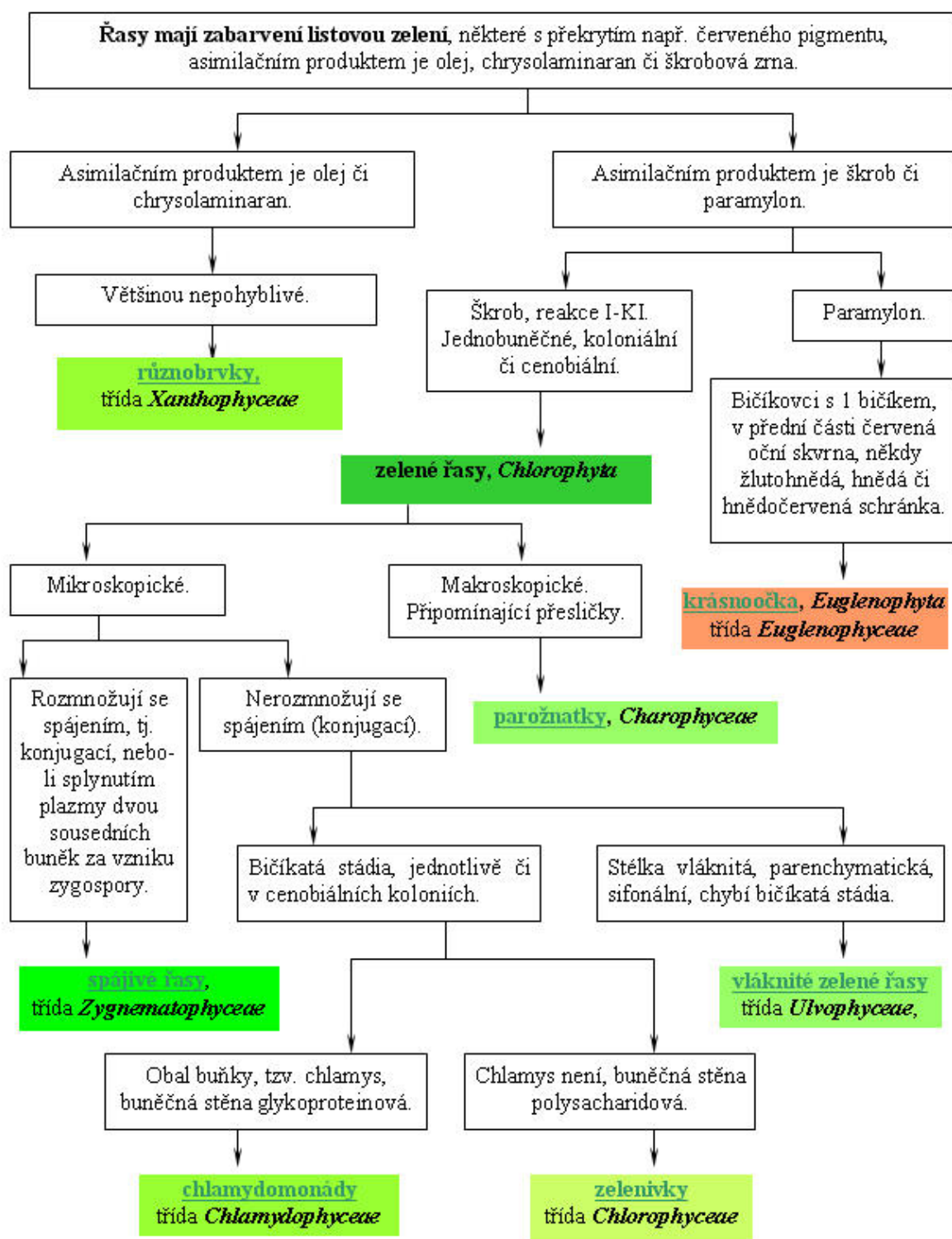
Řasy jsou mikroskopicky (většinou) pozorovatelné nižší rostliny (*Thallobionta*), které řadíme z hlediska charakteru buňky mezi organismy eukaryotické (jádro s jadernou membránou). Jejich tělo tvoří stélka. [38]

Buněčná stěna je polysacharidová. Fotosyntetickými pigmenty jsou *chlorofyl a* a *b*, α - a β -karoten a několik karotenoidů. Poměr *chlorofylů a* i *b* a α - a β -karotenů je stejný jako u vyšších rostlin. Chloroplast má dvě obalné membrány a 2–6 thylakoidů v jedné lamele. Je bez spojení s buněčným jádrem. Vyvinut je pyrenoid – bílkovinné tělísko, obsahující rubisco enzym, který váže oxid uhličitý v temnostní fázi fotosyntézy. [35]

Řasy žijí převážně ve vodním prostředí, kde tvoří autotrofní složku společenstva. Jejich výskyt je dán charakterem biotopu a ročního období (sezónní dynamika druhů). Z hlediska obývaného biotopu stojatých a tekoucích vod lze rozlišit řasy fytoplanktonní (osidlují volnou vodu, vznášejí se pasivně nebo se pohybují pomocí bičíků a brv), perifytonní (tvoří nárosty na ponořených rostlinách, kamenech a jiných substrátech) a bentické (obývající dno). [38]

2.4.2 Systematika řas

Systematika (taxonomie) je vědní obor, který se zabývá teorií a praxí klasifikace organismů. Jejím cílem je klasifikovat všechny známé biologické skupiny (taxony) podle určitých pravidel do jednotlivých hierarchicky uspořádaných biologických kategorií. V širším slova smyslu se taxonomie překrývá s biologickou systematikou, tedy vědou, která studuje nejen klasifikace, ale i obecné principy variability (diverzity) a její příčiny a důsledky. Důležitou roli hraje tzv. identifikace čili určování (determinace) druhu, při níž se snaží zařadit nalezené jedince do již známých taxonů (např. druhů, rodů, čeledí). [41]



Obr. 6: Systematické dělení řas (zdroj: [38])

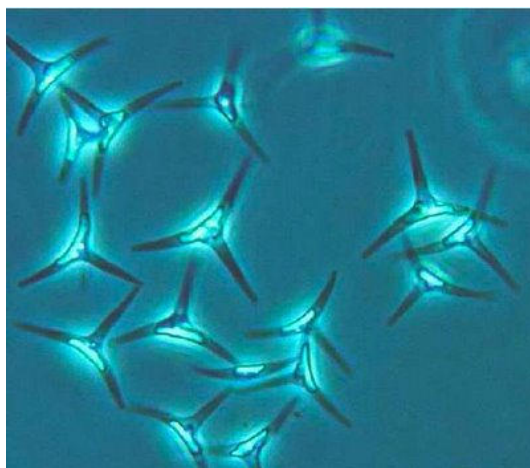
2.5 Řasové testy

2.5.1 Rozdělení řasových testů podle typu řas

Existují řasové testy mořskými řasami a řasové testy se sladkovodními řasami.

Řasové testy s mořskými řasami

V řasových testech pro mořské ekosystémy, Algal marine bioassay, dle metodiky ISO 10253, se používají jako testovací organismy rozsivky *Phaeodactylum tricornutum*. Tato metoda je využívána zejména v přímořských oblastech. [17, 27, 32]



Obr. 7: Mořská řasa *Phaeodactylum tricornutum* (zdroj: bioinformatics.psb.ugent.be)

Řasové testy se sladkovodními řasami

Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus quadricauda*, *Desmodesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata* je standardizována metodikou ČSN EN ISO 8692 [17, 27]. Alternativou k těmto testům mohou být testy miniaturizované (probíhají na mikrodestičkách) nebo testy využívající imobilizované řasy (alginátové kuličky) [3].



Obr. 8: *Desmodesmus quadricauda* (zdroj: www.lanuv.nrw.de)

2.5.2 Význam řasových testů

Řasové testy toxicity slouží k testování možných toxických účinků látek a vzorků na vodní producenty. Test umožňuje sledovat nejen inhibiční (toxické) účinky látek, ale také stimulační

efekty, tzv. úživnost. Díky rychlému nárůstu řas je možné kromě akutního působení pozorovat i chronické účinky testovaných látek. [13, 25, 48]

Nejpoužívanější je test toxicity na řasách založený na růstu řas. Růstový biotest je nejspolehlivějším kritériem pro stanovení toxicity či trofie vody. Reprodukční proces je nejcitlivějším, kritickým momentem v životním cyklu všech organismů. Pokud je testovací organismus schopen v testovaném vzorku úspěšně se rozmnožovat alespoň tři generace, pak je velmi pravděpodobné, že tuto látku bude snášet trvale. [14, 18]

Specifičnost testů využívajících řasy spočívá v tom, že během doby expozice (obvykle 3 až 4 dny) je toxickému účinku vystaveno 4–5 generací populace. Lze tedy hovořit o subchronickém testu toxicity. [24]

2.5.3 Princip standardního řasového testu

V České republice je za standardní test považován test na sladkovodní řase *Desmodesmus subspicatus* a řase *Pseudokirchneriella subcapitata*. Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas je standardizovaná metodikou ČSN EN ISO 8692 a OECD 201.

Jednodruhové kmeny se kultivují po několik generací v definovaném živném mediu, obsahujícím koncentrační řadu zkoušeného vzorku, připravenou smícháním příslušných objemů růstového média, zkoušeného vzorku a inokula exponenciálně rostoucích řasových buněk. Zkoušené sady jsou inkubovány po dobu 72 ± 2 hodin, při teplotě 23 ± 2 °C a kontinuálním osvětlení 6 000–10 000 luxů. Za stejných podmínek je nasazena kontrolní sada, kdy je řasa kultivována pouze v definovaném živném mediu. Pro každou koncentraci se nasazují dva paralelní testy.

Odezva řasové kultury na účinek testované látky se projeví jako inhibice, tedy snížení růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolním kulturám rostoucím za stejných podmínek. [7, 42]

2.5.4 Provedení standardního řasového testu

Předběžný test

V předběžném testu se vzorek o neznámé toxicitě podrobí první zkoušce s testovacími organismy. Jde o to zjistit, zda látka vykazuje toxické účinky či nikoliv. Používají se dvě paralelní nasazení se dvěma kontrolami. Nedojde-li k úhynu žádného organismu, je předběžný test hodnocen jako negativní a přistoupí se k ověřovacímu testu. [47]

Ověřovací test

Negativní výsledek předběžného testu se ověřuje v šesti paralelních nasazeních. Nedojde-li v testovaných roztocích k úhynu o 10 % převyšující úhyn v kontrole, je i zde výsledek hodnocen jako negativní. Další testování se neprovádí. Je-li výsledek pozitivní, úhyn v testovaném vzorku převýší o více než 10 % úhyn v kontrole, záleží další postup na míře imobilizace či úhynu. V případě mortality nižší než 50 % se další testy neprovádějí a zjištěné skutečnosti se zaznamenají do protokolu. Překročí-li mortalita 50 %, přistupuje se k orientačnímu testu. [47]

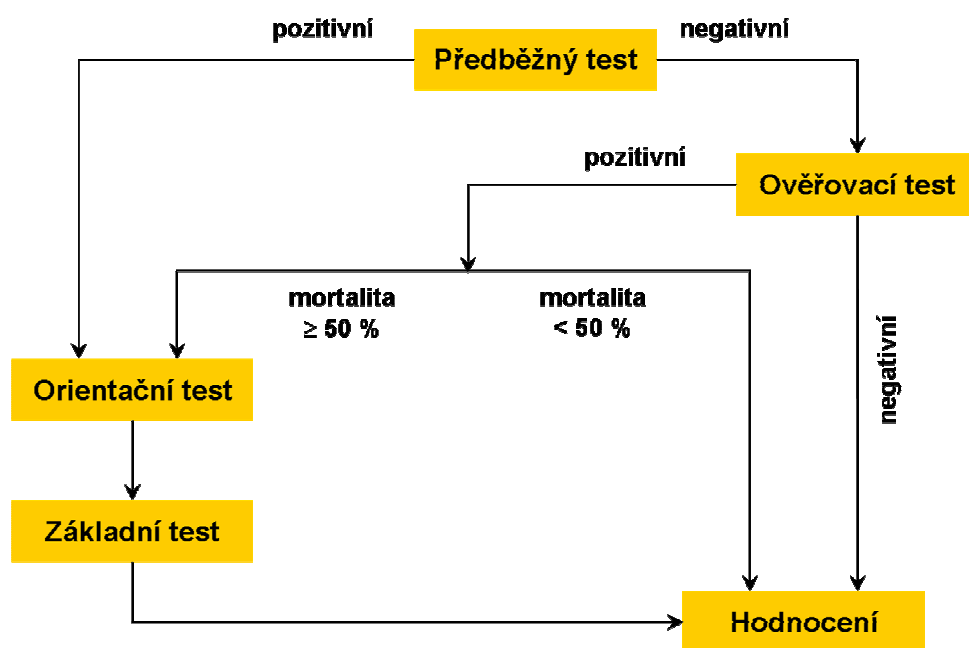
Orientační test

Účelem tohoto testu je určení koncentračního rozmezí, ve kterém lze očekávat hodnotu EC_{50} testované látky. Používá se zde zpravidla 10 koncentrací vzorku, volených v širokém rozpětí. Do tohoto testu se nasazuje menší počet pokusných organismů, obvykle postačuje testovat jednu koncentrační řadu a do každé testované koncentrace nasadit 4 organismy. Cílem je zjis-

tit nejvyšší koncentraci látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci organismů NO-EC a nejnižší koncentraci, která již působí letálně LOEC. [47]

Základní test

Základní test slouží k vlastnímu určení hodnoty EC_{50} . Test sestává zpravidla ze 7 různých koncentrací vzorku v rozmezí stanoveném orientačním testem. Ředění se provádí tak, aby kolem předpokládané hodnoty EC_{50} došlo k úhynu nebo imobilizaci 5–95 % organismů ve třech či více ředěních. Jako nejvyšší a nejnižší koncentrace ředící řady se volí limitní koncentrace zjištěné orientačním testem. Pro každou koncentraci se nasazují 2–3 paralelní nasazení. Po určité době expozice dané konkrétním testem se odečítá počet uhynulých či imobilizovaných organismů. Ze zjištěných údajů se spočítá hodnota EC_{50} . Na začátku i konci pokusu se zaznamenává teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH v každé testované koncentraci. [47]

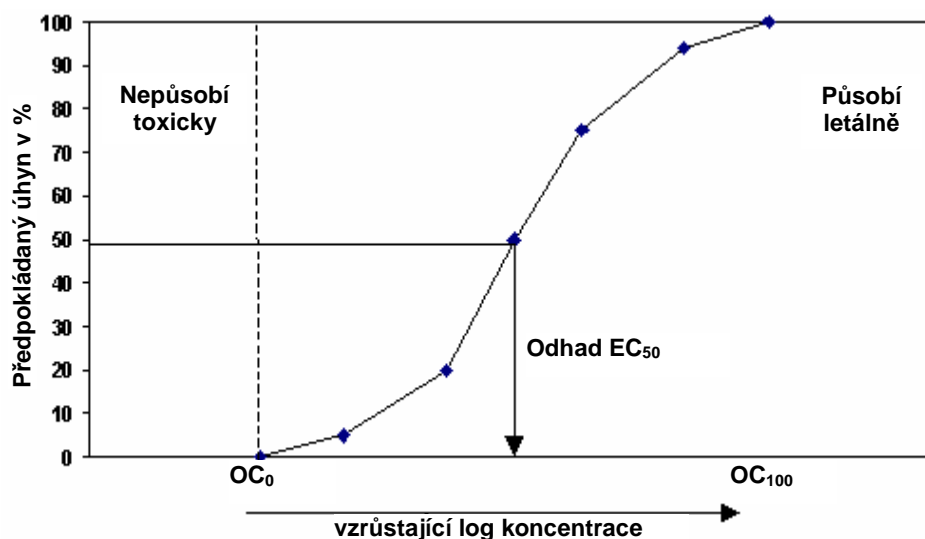


Obr. 9: Schéma provedení řasového testu

2.5.5 Volba koncentračních řad

Interval zpravidla sedmi koncentrací v rozmezí OC_0 (nejvyšší koncentrace látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci organismů) až OC_{100} (nejnižší koncentrace, která již působí letálně) je třeba rozdělit tak, abychom v ideálním případě po provedení testu obdrželi 5 hodnot tzv. parciálních mortalit (v případě sedmi koncentrací), tzn. úhynů větších než 0 % a menších než 100 %. Způsob volby a rozvržení testovaných koncentrací zobrazuje obr. 10. Jedna koncentrace by se měla co nejvíce blížit hodnotě LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} , dvě by měly být mezi hodnotou OC_0 a LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} , dvě mezi OC_{100} a LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} a dvě koncentrace by měly odpovídat hodnotám OC_0 a OC_{100} . Rozvržení koncentrací by mělo být okolo hodnoty LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} symetrické. Koncentrační řada by měla být logaritmická, následující koncentrace by měla být vždy k -krát větší než předchozí. Koeficient k se vypočítá z následujícího vztahu, kde n představuje počet volených koncentrací, obvykle 7. [22]

$$\log k = \log \frac{OC_0}{OC_{100}^{n-1}} \quad (1)$$



Obr. 10: Způsob volby testovaných koncentrací v intervalu OC_0 až OC_{100} (zdroj: www.vscht.cz)

2.5.6 Zkušební organismy

Podle ČSN EN ISO 8692 je možné jako zkušební organismy využít následující planktonní sladkovodní druhy řas:

- *Desmodesmus subspicatus*,
- *Pseudokirchneriella subcapitata*.



Obr. 11: *Desmodesmus subspicatus*
(zdroj: galerie.sinicearasy.cz)



Obr. 12: *Pseudokirchneriella subcapitata*
(zdroj: www.cefas.co.uk)

Desmodesmus subspicatus je zástupcem cenobiálního typu chlorokokální řasy. Buňky se převážně vyskytují jednotlivě. Typické je i sdružování buněk do coenobií po 4, 8, velmi vzácně po 16. [35]



a) jedinec
(zdroj: www.butbn.cas.cz)



b) čtyřbuněčné coenobium
(zdroj: www.ibacon.de)

Obr. 13: *Desmodesmus subspicatus*

Tab. 1: Taxonomie *Desmodesmus subspicatus* [34]

Říše	<i>Eukaryota</i>
Oddělení	<i>Chlorophyta</i>
Třída	<i>Chlorophyceae</i>
Řád	<i>Scenedesmales</i>
Rod	<i>Desmodesmus</i>
Druh	<i>Desmodesmus subspicatus</i>

2.5.7 Použitelnost zkušební metody

Tato zkušební metoda se nejsnadněji používá pro látky rozpustné ve vodě, které za podmínek zkoušky pravděpodobně ve vodě zůstanou. Pro zkoušení látek, které jsou těkavé, silně adsorbují, jsou zbarvené, mají nízkou rozpustnost ve vodě, nebo látek, které mohou nepříznivě ovlivňovat dostupnost živin či minerálů ve zkušebním médiu, mohou být potřebné určité úpravy popsaného postupu (např. uzavřený systém, klimatizace zkušebních nádob). U látek s omezenou rozpustností ve zkušebním médiu nebude pravděpodobně možné kvantitativně stanovit EC₅₀. Metodu lze použít pro látky, které přímo neovlivňují měření růstu řas. [11, 31]

Před provedením zkoušky je užitečné ověřit tyto informace:

- rozpustnost látky ve vodě,
- tlak par,
- strukturní vzorec,
- čistotu látky,
- chemickou stabilitu ve vodě a na světle,
- metody analýzy pro kvantitativní stanovení látky ve vodě,
- hodnotu pK_a,
- rozdělovací koeficient n-oktanol/voda,
- výsledky zkoušky „snadné“ biologické rozložitelnosti. [11]

2.5.8 Faktory ovlivňující průběh řasového testu

Řasy ke svému životu potřebují živiny, světlo, CO₂, teplo, velikost inokula. Růst řas tedy může být limitován kterýmkoli z těchto faktorů. [15]

Živiny

Důležitou součástí řasových testů je živné médium. Živné médium je úplné syntetické kultační médium, jehož prostřednictvím jsou řasám během kultivace při expozici testované látky dodávány živiny v podobě mikro- a makronutrientů v koncentracích, které převyšují jejich koncentraci v přírodních vodách. Růst řasové kultury v živném médium je rychlý, během 24 hodin se může populace zdvojnásobit až ztrojnásobit. Použití má vliv na relevanci výsledků, které se mohou lišit až o řády v závislosti na použitém živném médiu. [16]

Pro testování řas se používají různá živná média, příklady jsou uvedeny v následujícím textu.

■ Živné médium pro testy na sladkovodních zelených řasách dle normy ČSN EN ISO 8692
Připraví se čtyři vodné zásobní roztoky živin podle složení uvedeného v následující tabulce.

Tab. 2: Složení živného média dle normy ČSN EN ISO 8692

Zásobní roztok	Živina	Hmotnostní koncentrace v zásobním roztoku
I makrosložky	NH ₄ Cl	1,5 g/l
	MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2 g/l
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l
II Fe-EDTA	FeCl ₃ .6H ₂ O	64 mg/l
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100 mg/l
III stopové prvky	H ₃ BO ₃	185 mg/l
	MnCl ₂ .4H ₂ O	415 mg/l
	ZnCl ₂	3 mg/l
	CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5 mg/l
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7 mg/l
IV NaHCO ₃	NaHCO ₃	50 g/l

Zásobní roztoky se sterilizují membránovou filtrací (průměr pórů 0,2 µm). [7]

■ Živné médium CCALLA Bristol BB (médium BB)

Médium připravuje a dodává Botanický ústav AV v Třeboni. Je vhodné k testování látek na většině druhů řas. [4]

Tab. 3: Složení živného média BB

Roztok a (1 000 ml)		Roztok b (100 ml)		Roztok e (100 ml)	
NaNO ₃	25 g	Chelaton III	5,0 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,882 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5 g	KOH	3,1 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,144 g
K ₂ HPO ₄	7,5 g	Roztok c (100 ml)		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,242 g
KH ₂ PO ₄	17,5 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,498 g	nebo MoO ₃	0,071 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5 g	H ₂ SO ₄ konc.	0,1 ml	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,157 g
NaCl	2,5 g	Roztok d (100 ml)		Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,049 g
		H ₃ BO ₃	1,142 g		

■ Jaworského médium

Vhodné pro sladkovodní řasy. [4]

Tab. 4: Složení živného média Jaworského

Roztok (200 ml)	Živina	Množství (g)
I	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	4,0
II	KH ₂ PO ₄	2,48
III	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10,0
IV	NaHCO ₃	3,18
V	EDTAFeNa	0,45
	EDTANa ₂	0,45
VI	H ₃ BO ₃	0,496
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,278
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,20
VII	Cyanocobalamin	0,008
	Thiamine HCl	0,008
	Biotin	0,008
VIII	NaNO ₃	16,0
IX	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7,2

Světlo

Při provádění testu je nutné dodržovat předepsaný světelný režim. Růstová rychlost řas se zvyšuje se světelnou intenzitou podél saturační křivky. Hladina pro světelnou saturaci (nasyčenost) je druhově závislá a závisí také na teplotě a živinovém stavu řas. Standardizovaný test předepisuje kontinuální osvětlení přibližně 8 000 luxů u norem ISO, OECD a EEC. Tato ozáření je však nízká vzhledem k předepsané teplotě (přibližně 23–24 °C) zejména pro nejčastěji používané druhy *Pseudokirchneriella capricornutum* a *Desmodesmus subspicatus*. Problém je také v tom, že světlo absorbuje i samotná řasová suspenze. Míchání kultury tento efekt může redukovat. V testu toxicity by měly být světelné podmínky konstantní, aby podporovaly exponenciální růst, kterého je dosaženo při držení nízké koncentrace biomasy, při stálém míchání a při použití malého objemu kultury řas. [17, 37]

Oxid uhličitý

Ve zkoušené nádobě musí být zajištěn dostatek CO₂, který je nutný pro růst řasy. Podmínkou jeho využití je pH = 8,1 ± 0,2 živného média.

Teplota

Pro daný test je třeba dodržovat správnou teplotu. Norma ČSN EN ISO 8692 udává teplotu 23 ± 2 °C. Nesprávná teplota může pro organismus představovat nežádoucí stres, který může vést k jeho nestandardnímu chování.

Velikost inokula

Inokulum, neboli počet řasových buněk na začátku testu, by neměl přesáhnout 10 000 ± 2 000 buněk v 1 ml. Inokulum se odebírá z exponenciálně rostoucí zásobní kultury a musí být adaptováno na již zmíněné podmínky testu (teplotu, tlak, osvětlení). [37]

2.5.9 Vyhodnocování řasového testu

Cílem testu je stanovit hodnotu LC₅₀, EC₅₀ nebo IC₅₀ [47], popř. další ekotoxikologické hodnoty, jako jsou NOEC, LOEC [28].

Důležitou otázkou pro vyhodnocování řasových biotestů je variabilita v nárůstu kontrol. Jde o to, z kolika procent se mohou lišit hustoty buněk v kontrolních suspenzích. Optimální by bylo, aby se lišily minimálně (do 5 %), jako je tomu u ostatních testů (perloočky, ryby). Realita taková není. Pracoviště, která se touto problematikou zabývají delší dobu, mají zkušenost, že odchylka až do 30 % inhibice nemusí znamenat toxické účinky látek přítomných v testovaném vzorku, ale může se jednat pouze o přirozenou variabilitu testovaného systému.

Z výše uvedeného vyplývá, že lze jen komplikovaně určovat hodnoty efektivních koncentrací pro nízká procenta inhibice. Variabilita přírodních systémů způsobuje oscilaci nárůstu biomasy okolo nulové hodnoty inhibice odpovídající nárůstu v kontrole v rozmezí 15 %. To znamená, že určovat inhibiční koncentrace nižší než 15 (EC₁₅ a méně) je velmi obtížné, ne-li nereálné.

Hodnota EC₅₀ je dosud nejlepší hodnotou, pomocí níž lze srovnávat toxické účinky různých látek na řasy. [21]

Stanovení hodnoty EC₅₀ pomocí růstových rychlostí

EC₅₀ je koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu vede k 50% snížení růstu testovacího organismu. Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo z výtěžku se v příslušných případech používají symboly E_rC a E_yC.

Výpočet inhibice růstu je založen na porovnání růstových rychlostí μ řasové kultury ve zkoušených a kontrolních sadách.

Nejdříve se tedy vypočítá růstová rychlost za pomoci rovnice (2):

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}, \quad (2)$$

kde

t_0 je doba začátku testu,

t_L doba ukončení testu,

x_0 jmenovitá počáteční hustota buněk,

x_L hustota buněk měřená v době t_L .

Následně se vypočítá inhibice v procentech pro každou zkoušenou koncentraci z následující rovnice (3) [7, 50]:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100, \quad (3)$$

kde

$I_{\mu i}$ je inhibice v procentech (růstová rychlost) pro zkoušenou koncentraci i ,

μ_i střední růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci i ,

μ_c střední růstová rychlost u kontrolního vzorku.

Stanovení hodnoty EC_{50} pomocí integrálu biomasy

Podstata výpočtu spočívá v určení a následného porovnání ploch pod růstovými křivkami pro jednotlivé testované koncentrace. Výpočet plochy pod růstovou křivkou řasové kultury se provádí pomocí následující rovnice (4):

$$A_i = \frac{(N_1 - N_0) \cdot t_1}{2} + \frac{(N_1 + N_2 - 2N_0) \cdot (t_2 - t_1)}{2} + \dots + \frac{(N_{n-1} + N_n - 2N_0) \cdot (t_n - t_{n-1})}{2}, \quad (4)$$

kde

A_i je plocha pod růstovou křivkou pro danou koncentraci,

N_0 jmenovitá počáteční hustota buněk (počet buněk v 1 ml),

N_1 změřená hustota buněk v čase t_1 (počet buněk v 1 ml),

N_n změřená hustota buněk v čase t_n (počet buněk v 1 ml),

t_1 doba prvního měření od počátku testu v hodinách,

t_n doba n -tého měření od počátku testu v hodinách.

Inhibice nárůstu řas v % pro danou koncentraci zkoušené látky se vypočítá na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami zkoušeného a kontrolního vzorku. Výpočet se provede pomocí rovnice (5) [20]:

$$I_i = \frac{A_c - A_i}{A_c} \cdot 100, \quad (5)$$

kde

I_i je inhibice nárůstu řas pro danou koncentraci toxikantu, zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami,

A_c průměrná plocha pro kontrolní vzorek (nulová koncentrace toxikantu),

A_i průměrná plocha pro danou koncentraci toxikantu.

Další hodnoty, které mohou být z ekotoxikologického testu vyhodnoceny

■ LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)

Je nejnižší zkušební koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na snížení růstu (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musejí však mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

■ NOEC (No Observed Effect Concentration)

Jde o nejvyšší zkušební koncentraci, při níž není pozorováno žádné významné snížení růstu nebo růstové rychlosti vzhledem ke kontrole. Hodnota NOEC odpovídá zkoušené koncentraci bezprostředně pod hodnotou LOEC. [9]

Stimulace růstu

Při nízkých koncentracích bývá někdy pozorována stimulace růstu (negativní inhibice). To může být důsledkem buď hormese (toxická stimulace), nebo přidáním stimulujících růstových faktorů se zkušebním materiálem k minimálnímu použitému médiu. Přidání anorganických živin by neměl mít žádný přímý účinek, protože zkušební médium by mělo po celou dobu zkoušky udržovat přebytek živin. Stimulaci nízkými dávkami lze ve výpočtech EC_{50} obvykle ignorovat, pokud není extrémní. Je-li však extrémní nebo má-li být vypočtena hodnota EC_x pro nízké x , může být zapotřebí speciálních postupů.

Netoxická inhibice růstu

Zkušební materiály absorbující světlo mohou způsobit snížení růstové rychlosti, protože stínění snižuje množství dostupného světla. Takové účinky fyzikální povahy je zapotřebí oddělit od toxických účinků, a to úpravou zkušebních podmínek, přičemž takové fyzikální účinky je zapotřebí uvádět ve zkušebním protokolu samostatně. [11]

2.5.10 Validita zkoušky

Výsledky testu se považují za platné, jestliže jsou splněna následující kritéria:

- hustota buněk u kontrolního vzorku musí v průběhu 72 hodin zvýšit více než 16krát,
- pH v kontrolním vzorku se nemá změnit během testu o více než 1,5 jednotky,
- zjištěná hodnota 72h EC_{50} dichromanu draselného je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

2.5.11 Využití řasových testů

Testy na řasách mají v hodnocení ekotoxicity nenahraditelné zastoupení, jelikož řasy jsou prvním článkem potravního řetězce.

V praxi se řasové testy využívají:

- pro posouzení rizikovosti průmyslových odpadů a kalů, jejich kategorizaci a zjištění vlastností způsobujících nebezpečnost odpadů;
- stanovení akutní toxicity chemických látek a chemických přípravků z hlediska nebezpečnosti pro životní prostředí;
- pro testování výrobku za účelem získání známky „Ekologicky šetrný výrobek“, udělovaný Ministerstvem životního prostředí;

- pro stanovení toxického rizika znečištění pitných, podzemních, povrchových a odpadních vod;
- pro získání prvotních informací a poznatků při haváriích spojených s únikem toxických látek do vodních toků a nádrží;
- pro městské a průmyslové čistírny odpadních vod všech typů (hodnocení míry toxicity vstupů na ČOV, vstupů do aktivace a výstupů z ČOV k ověření účinnosti čistírenských procesů);
- pro pitné a povrchové vody speciální testy toxicity pro posouzení dlouhodobého působení chemických látek ve stopových koncentracích na reprodukční cyklus vodních organismů;
- pro testování výrobků přicházejících do styku s pitnou vodou, které mají možný vliv na její kontaminaci (např. nátěry nádrží), a také obalových materiálů, přicházejících do přímého styku s potravinami. [10]

Hodnocení ekotoxicity je součástí požadavků ve vyhlášce č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, ve znění pozdějších předpisů, a také v základní chemické legislativě v současnosti stále platné, tedy zákona č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích, ve znění pozdějších předpisů. [43]

2.6 Legislativa

Česká legislativa

- Zákon č. 356/2003 Sb.,
o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, v platném znění.
- Zákon č. 326/2004 Sb.,
o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, v platném znění.
- Zákon č. 378/2007 Sb.,
o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), v platném znění.
- ČSN EN ISO 8692
Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas.
Norma určuje metodu stanovení inhibice růstu jednobuněčných zelených řas látkami a směsmi obsaženými ve vodě nebo odpadní vodou. Tato metoda je použitelná pro látky, které jsou snadno rozpustné ve vodě. S uzpůsobeními této metody, popsány v ISO 14442 a ISO 5667-16, mohou být zkoušeny inhibiční účinky málo rozpustných organických a anorganických látek, těkavých sloučenin, těžkých kovů a odpadních vod. V příloze normy je obsažena screeningová zkouška inhibice růstu řas v odpadní vodě. [46]
- ČSN ISO 14442
Jakost vod – Návod na provedení zkoušek inhibice růstu řas s málo rozpustnými materiály, těkavými sloučeninami, kovy a odpadní vodou.
Norma uvádí postupy pro zkoušky inhibice růstu řas s obtížnými sloučeninami, které nejsou zahrnuty do metod popsanych v ISO 8692 a ISO 10253. Hlavními předměty obsaženými v tomto návodu jsou metody pro přípravu zkoušených látek ke zkoušení a postupy potřebné k provedení příslušné zkoušky. Do tohoto návodu jsou zahrnuty následu-

jící zkoušené látky: a) slabě rozpustné čisté organické sloučeniny b) slabě rozpustné směsi organických látek c) slabě rozpustné anorganické materiály d) těkavé látky e) odpadní vody a environmentální vzorky obsahující vodu a sedimenty f) zabarvené a/nebo zakalené vzorky g) sloučeniny těžkých kovů. [46]

- ČSN EN ISO 5667-16

Jakost vod – Odběr vzorků – Část 16: Pokyny pro biologické zkoušení vzorků.

Norma je českou verzí evropské normy EN ISO 5667-16:1998. Evropská norma EN ISO 5667-16:1998 má status české technické normy. V této šestnácté části (ČSN EN) ISO 5667 jsou uvedeny praktické pokyny pro odběr vzorků a jejich předběžnou úpravu, pro provádění zkoušek a hodnocení vod na podkladě biologických zkoušek. Jsou zde informace o tom, jak zvládat problémy biologického zkoušení související s povahou vzorku vody a s vhodností navržené zkoušky. Záměrem této části je poskytnout praktické zkušenosti týkající se bezpečnostních opatření, která je třeba dodržovat podle metodických postupů, osvědčených při řešení nebo překonávání některých problémů při biologickém zkoušení vod. Jsou zde uvedeny odkazy na stávající mezinárodní normy a směrnice (včetně směrnic OECD). Bylo použito i informací převzatých z publikovaných článků nebo ústního sdělení. Pojednává se zejména o problémech s látkami při odběru vzorků, předběžné úpravě a přípravě vzorků vody určených k biologickému zkoušení, a o zpracování vzorků v průběhu zkoušky, zvláště o zpracování vzorků vod, které obsahují nestálé nebo odstranitelné složky. Tuto šestnáctou část (ČSN EN) ISO 5667 nelze používat pro bakteriologické rozborů vody. Vhodné metody jsou popsány v jiných mezinárodních normách. Norma (zejména v čl. 12.3 – Statistické hodnocení) vysvětluje též pojmy EC (efektivní koncentrace), IC (inhibiční koncentrace), LC (letální koncentrace) i LOEC (nejnižší pozorovatelná účinná koncentrace) a NOEC (koncentrace bez pozorovatelných účinků). [46]

- ČSN EN ISO/IEC 17025

Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří

První vydání normy ČSN EN ISO/IEC 17025 z roku 2001 (v ISO byla tato norma vydána v roce 1999 a v CEN v roce 2000) obsahovalo veškeré požadavky na zkušební a kalibrační laboratoře, které musejí tyto plnit, pokud chtějí prokázat, že provozují systém managementu, jsou odborně způsobilé a jsou schopny poskytovat technicky platné výsledky. První vydání se odkazovalo na normy ISO 9001:1994 a ISO 9002:1994. Tyto normy byly nahrazeny normou ISO 9001:2000, a to bylo příčinou nezbytnosti úprav normy ISO/IEC 17025. Ve druhém vydání normy ČSN EN ISO/IEC 17025 z roku 2005 (v ISO i v CEN vydáno v roce 2005) jsou články normy oproti předchozímu vydání změněny nebo doplněny, pouze pokud je to s ohledem na normu ISO 9001:2000 považováno za nezbytné. Akreditační orgány, které uznávají způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří, mají používat tuto mezinárodní normu jako základ pro jejich akreditaci. V kapitole 4 jsou stanoveny požadavky na spolehlivý management. V kapitole 5 jsou stanoveny požadavky na technickou způsobilost laboratoře provádět určité typy zkoušek a/nebo kalibrací.

Evropská legislativa (Ekotoxikita)

- OECD 201: Alga, Growth Inhibition Test;
- Nařízení Komise (ES) č. 761/2009.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

3.1.1 Zkušební nádoby

Zkušební nádoby by měly být celoskleněné nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Jednotlivé díly je zapotřebí důkladně vymýt, aby bylo zajištěno, že žádné organické ani anorganické nečistoty nebudou moci narušovat růst řas nebo složení zkušebních roztoků.

Zkušebními nádobami budou za normálních podmínek skleněné baňky takových rozměrů, aby pojaly dostatečný objem kultury pro měření během zkoušky a umožnily dostatečný hmotnostní přenos CO_2 z atmosféry. [11]

3.1.2 Binokulární mikroskop L1100B SM 5 A

Binokulární mikroskop L1100B SM 5 A byl používán ke stanovení počtu buněk řasového inokula.



Obr. 14: Binokulární mikroskop L1100B SM 5 A

Tab. 5: Možnosti zvětšení binokulárního mikroskopu L1100B SM 5 A

Komponenty	Zvětšení	Poznámka
Okulár	10× (18 mm)	
	16× (11 mm)	používané v diplomové práci
Objektiv	4×/0,1	
	10×/0,25	
	40×/0,65	používané v diplomové práci
	100×/1,25	

3.1.3 Počítací komůrky

Počítací komůrka Cyrus I

Počet jednotlivých buněk v daném objemu řasového inokula se počítal pod mikroskopem L1100B SM 5 A pomocí počítací komůrky Cyrus I.

Tab. 6: Parametry počítací komůrky Cyrus I

Objem	0,01 ml
Plocha	100 mm ²
Hloubka	0,10 mm
Počet čtverců	1 600

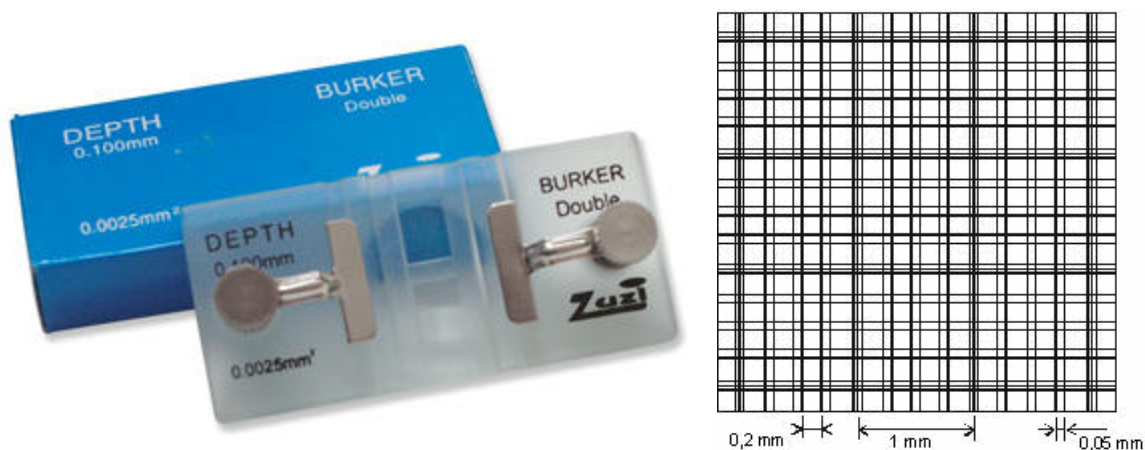


Obr. 15: Počítací komůrka Cyrus I (zdroj: www.letpraha.cz/)

Bürkerova počítačí komůrka

Tab. 7: Parametry Bürkerovy počítací komůrky

Objem	0,01 ml
Plocha	0,002 5 mm ²
Hloubka	0,10 mm



Obr. 16: Bürkerova počítací komůrka (zdroj: www.labotienda.com)

3.1.4 Spektrofotometr HACH DR/4000 U

Spektrofotometr HACH DR/4000 U byl používán ke zjištění korelace mezi počtem buněk řasové suspenze a její absorbancí při vlnové délce 683 nm ve VIS oblasti spektra. Dále byl používán ke stanovení počtu buněk v zásobní kultuře a koncentračních řadách při provádění jednotlivých testů.



Obr. 17: Spektrofotometr HACH DR/4000 U

Na spektrofotometru HACH DR/4000 U je výrobcem nastaveno několik metod stanovení různých anorganických a organických látek, jakožto i měření fyzikálních a chemických parametrů.

Software navíc umožňuje vytvořit vlastní metodu pro stanovení určité látky s nastavením vlastních parametrů metody.

Vytvoření metody

V hlavní nabídce zvolíme možnost vytvořit *User program* a zadáme požadované parametry:

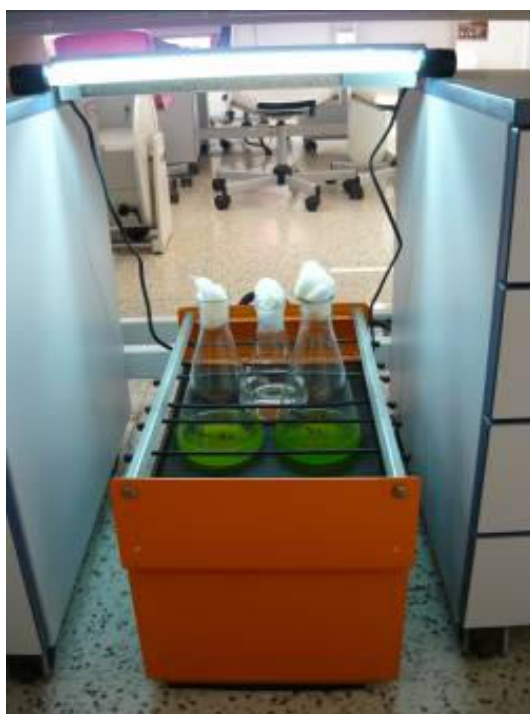
- název metody,
- jednotky (např. mg/l),
- chemickou formu stanovované látky (např. kationty, anionty, mocenství),
- nejnižší limit koncentrační řady,
- nejvyšší limit koncentrační řady,
- vlnovou délku, při které je měření prováděno.

3.2 Metodika

3.2.1 Kultivace zásobní kultury

Umístění

Kultivace zásobní kultury byla prováděna v živném médiu v 300ml Erlenmeyerových baňkách, které byly umístěny na třepače v klimatizované laboratoři. Požadované kontinuální osvětlení zajišťovala lampa GLO T5 HO A – 3900 se zářivkou AQUA MEDIC, aqualine T5 s výkonem 24 W. V místnosti byla udržována konstantní teplota 23 °C.

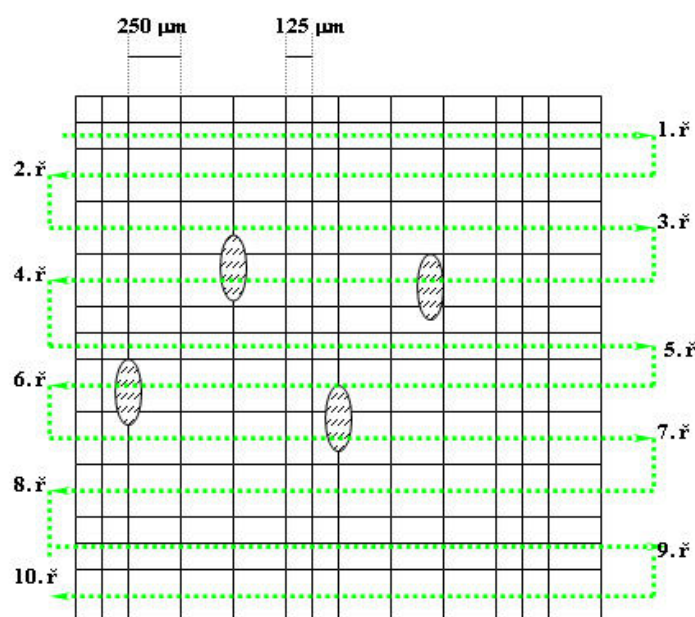


Obr. 18: Kultivace zásobní kultury

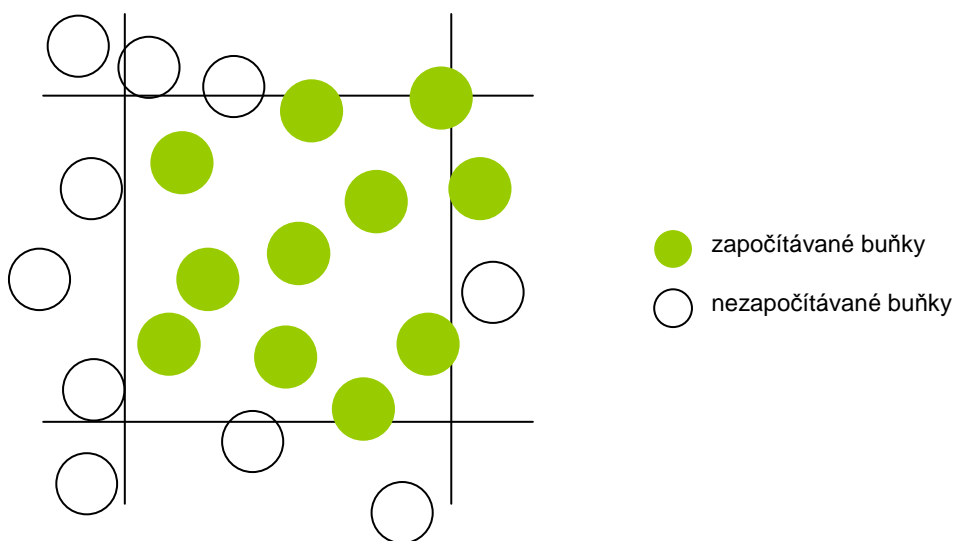
3.2.2 Stanovení počtu buněk řas

Vyhodnocení vyšetřené plochy počítací komůrky typu Cyrus I

Postup kvantifikace je zachycen na části komůrky, která má jinak 40 vodorovných a 40 svislých řad čtverečků o velikosti $250 \times 250 \mu\text{m}$. V případě zjišťování počtu organismů na ploše počítací komůrky se postupuje tak, že se začínají počítat organismy od 1. řádku zleva směrem doprava, po provedení kvantifikace se provádí kvantifikace ve 2. řádku zprava doleva atd., až např. do 10. řádku. Organismy částečně se dotýkající či mírně zasahující do plochy vyšetřovaného pásu se nepočítají; počítají se až v dalším posunu (na obr. 19 organismus mírně zasahující do 3. řádku se počítá až do 4. řádku). Je-li celkový počet organismů na této ploše o 40 čtvercích roven 4, potom se použije koeficient pro zjištění organismů celkem na ploše celé komůrky a v 1 ml (zde $k = 4 \times 2$), tj. $4 \text{ organismy} \times 8$, tj. 32 organismů v 1 ml vzorku. [38]



Obr. 19: Vyšetřené plochy počítací komůrky (zdroj: [38])



Obr. 20: Způsob počítání buněk ve čtverci

Postup

Po důkladném protřepání bylo ze zásobní kultury pomocí mikropipety odebráno 20 µl a naneseno na mřížku počítací komůrky Cyrus I, po přiložení krycího sklíčka se komůrka upevnila do mikroskopu.

Vyšetřeno bylo vždy 8 řádků po 40 čtvercích a každý roztok se propočítal třikrát.

Počty řas v jednotlivých řadách byly zaznamenávány a z jejich součtu byl vypočítán počet buněk řas v 1 ml (X) dle normy [6].

$$X = \frac{a \cdot K}{n \cdot z \cdot V}, \quad (6)$$

kde

X je počet buněk řas v 1 ml,

a počet jedinců nebo buněk v n čtvercích,

n počet vyšetřených čtverců,

z zahuštění vzorku,

K celkový počet čtverců v komůrce (Cyrus I: $K = 1\,600$),

V objem komůrky (Cyrus I: $V = 0,01$ ml).

3.2.3 Stanovení korelační křivky

Metodika zkoušky inhibice růstu zelených řas je velice náročná. Nejen počítání buněk řas hustých zásobních kultur, ale i opakované propočítávání jednotlivých zkoušených roztoků je velmi zdlouhavé. Korelační křivka tedy byla vytvořena za účelem rychlejšího vyhodnocování a tím zjednodušení náročnosti testu.

Korelace byla vytvořena mezi počtem řasových buněk a absorbancí řasové suspenze.

Postup

Ředěním zásobní kultury byly připraveny roztoky o různých koncentracích řasové kultury. Jednotlivé koncentrace byly propočítány pod mikroskopem pomocí počítací komůrky Cyrus I. Následně byla na spektrofotometru proměřena absorbance jednotlivých roztoků při vlnové délce 683 nm.

Příprava koncentrační řady

Na přípravu 10 ml roztoku o požadované koncentraci řasové kultury byly ze zásobní kultury pipetovány objemy, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 8: Příprava koncentrační řady pro korelaci

zásobní kultura: 4 785 000 buněk/1 ml		
Roztok	Objem	Předpokládaná hustota (počet buněk/1 ml)
1	0,3	143 550
2	0,4	191 400
3	0,6	287 100
4	0,8	382 800
5	1,0	478 500
6	2,5	1 196 250
7	5,0	2 392 500
8	10,0	4 785 000

3.2.4 Řasové testy se standardními testovacími látkami

■ Příprava živného média

Nejdříve se připraví živné médium. Pro účely diplomové práce bylo používáno Jaworského médium.

Přibližně k 500 ml destilované vody se z každého zásobního roztoku, uvedeného v tab. 9, pipetuje 1 ml a doplní se na objem 1 000 ml.

Tab. 9: Složení Jaworského média používaného v diplomové práci

Roztok (200 ml)	Živina	Množství (g)
I	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,0
II	KH_2PO_4	2,48
III	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,0
IV	NaHCO_3	3,18
V	EDTAFeNa	0,45
	EDTANa ₂	0,45
VI	H_3BO_3	0,496
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,278
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,20
VII	Cyanocobalamin	0,008
	Thiamine HCl	0,008
	Biotin	0,008
VIII	NaNO_3	16,0
IX	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7,2

■ Příprava předkultivace a inokula

Ke 150 ml živného média se přidalo množství inokula tak, aby výsledná hustota buněk nepřesáhla 10 000 buněk v 1 ml. Zvolená koncentrace byla 8 000 buněk v 1 ml. Ze známé hustoty

buněk v zásobní kultuře byl vypočítán objem 4,75 ml. Pro snadnější pipetování daného objemu se množství upravilo na 5 ml, což odpovídá koncentraci 8 421 buněk v 1 ml. Erlenmeyerova baňka s touto řasovou suspenzí byla umístěna na třepačku. Inkubace probíhala 3 dny za podmínek testu.

Později byla tato exponenciálně rostoucí předkultivace použita jako inokulum pro zkoušku. Bezprostředně před použitím předkultivace se změřila hustota buněk, aby se vypočítal potřebný objem inokula.

■ Volba koncentrační řady

Rozsah koncentrační řady byl zvolen podle známých hodnot E_rC_{50} pro standardní testovací látky, které udává norma ČSN EN ISO 8692.

Tab. 10: Koncentrační řada

Testovaná látka	Koncentrační řada (mg/l)
dichroman draselný	0; 0,4; 0,75; 0,8; 0,85; 0,9; 1; 2
3,5-dichlorfenol	0; 1; 3; 6; 6,5; 8; 10; 12

■ Příprava zkoušených a kontrolních sad

V 50ml odměrných baňkách bylo smícháno vypočítané množství inokula s trochou živného média, poté byl přidán vypočítaný objem testované látky potřebný pro vytvoření požadované koncentrace a roztok byl doplněn živným médiem po rysku. Roztoky byly důkladně promíchány a přelity do 250ml Erlenmeyerových baněk (zkušební nádoby). Pro každou koncentraci byly připraveny tři replikáty.

Stejným způsobem byly připraveny kontrolní vzorky, pouze se nepřidávala testovaná látka.

Zkušební nádoby byly překryty kouskem filtračního papíru s otvory, aby se zabránilo vzdušné kontaminaci a snížilo se odpařování vody a zároveň byl umožněn vstup CO_2 do nádob.

■ Inkubace

Inkubace probíhala 72 hodin. Z důvodů nedostatku místa byly zkušební nádoby umístěny na laboratorním stole. Kontinuální osvětlení bylo zajištěno stropními svítlidly, prostřednictvím klimatizace byla udržována konstantní teplota 23 °C.

Dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$

■ Příprava zásobního roztoku dichromanu draselného

Nejdříve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 g/l a postupným ředěním byly připraveny roztoky s rozsahem 0,4-2,0 mg/l v objemu 50 ml.



Obr. 21: Zásobní roztok $K_2Cr_2O_7$

■ Příprava koncentrační řady

Na přípravu 50 ml zkoušených roztoků byly pro jednotlivé koncentrace pipetovány objemy, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 11: Objemy $K_2Cr_2O_7$ pipetované pro přípravu koncentrační řady

c (mg/l) zkoušeného roztoku	V (ml) zásobního roztoku
0,40	0,250
0,75	0,469
0,80	0,500
0,85	0,531
0,90	0,563
1,00	0,625
2,00	1,250

■ Vyhodnocení

Po 72 ± 2 hodinách bylo provedeno vyhodnocení testu měřením absorbancí jednotlivých roztoků a spočítáním buněk pomocí komůrky Cyrus I pod mikroskopem pro ověření platnosti korelace.

3,5-dichlorfenol

■ Příprava zásobního roztoku 3,5-dichlorfenolu

Nejdříve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 g/l a postupným ředěním byly připraveny roztoky s rozsahem 1,0-12,0 mg/l v objemu 50 ml.



Obr. 22: Zásobní roztok 3,5-dichlorfenol

■ Příprava koncentrační řady

Na přípravu 50 ml zkoušených roztoků byly pro jednotlivé koncentrace pipetovány objemy, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 12: Objemy 3,5-dichlorfenolu pipetované pro přípravu koncentrační řady

<i>c</i> (mg/l) zkoušeného roztoku	<i>V</i> (ml) zásobního roztoku
1,0	0,417
3,0	1,250
6,0	2,500
6,5	2,710
8,0	3,333
10,0	4,166
12,0	5,000

Provedení testu je totožné jako u stanovení $K_2Cr_2O_7$. Navíc byl připraven slepý vzorek, který obsahoval pouze živné médium a 2,5 ml 3,5-dichlorfenolu pro ověření těkavosti.

■ Vyhodnocení

Po 72 ± 2 hodinách bylo provedeno vyhodnocení testu měřením absorbancí jednotlivých roztoků.

3.2.5 Řasové testy s vybranými chemickými látkami

Příprava živného média, předkultivace, provedení i vyhodnocení testu je totožné jako u testů se standardními testovacími látkami.

Navíc byl připraven jeden kontrolní vzorek s příměsí methanolu, pro vyloučení inhibice způsobené samotným rozpouštědlem.

Rozsah koncentrační řady zkoušených látek byl zvolen podle známých EC_{50} , které byly nalezeny v [4, 12, 39].

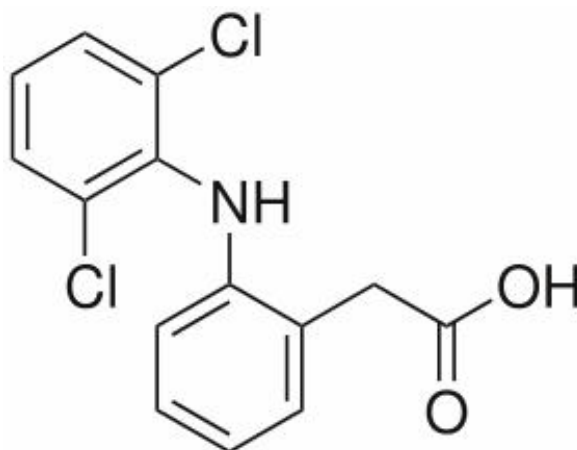
Kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová

Vyskytuje se ve formě bílého nebo slabě nažloutlého krystalického prášku, který je slabě hygroskopický. Ve vodě se rozpouští slabě, snadno rozpustný je v methanolu, hůře v acetonu a prakticky nerozpustný v etheru.

Kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová je účinnou látkou léčiva Diclofenac, které patří do skupiny nesteroidních antirevmatik, antiflogistik.

Tab. 13: Fyzikálně-chemické vlastnosti kyseliny 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octové

Chemická látka	Kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová
Název léčiva	Diclofenac
Sumární vzorec	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂
Molární hmotnost	296,15 g/mol
Rozpustnost ve vodě (25 °C)	23,73 mg/l
Teplota tání	280 °C



Obr. 23: Kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová (zdroj: en.wikipedia.org)

■ Příprava zásobního roztoku kyseliny 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl] octové

Nejdříve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 g/l a postupným ředěním byly připraveny roztoky s rozsahem 5,0-75,0 mg/l v objemu 50 ml.

■ Příprava koncentrační řady

Na přípravu 50 ml zkoušených roztoků byly pro jednotlivé koncentrace pipetovány objemy, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 14: Objemy kyseliny 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octové pipetované pro přípravu koncentrační řady

c (mg/l) zkoušeného roztoku	V (ml) zásobního roztoku
5	0,125
15	0,375
20	0,500
25	0,625
30	0,750
50	1,250
75	1,875

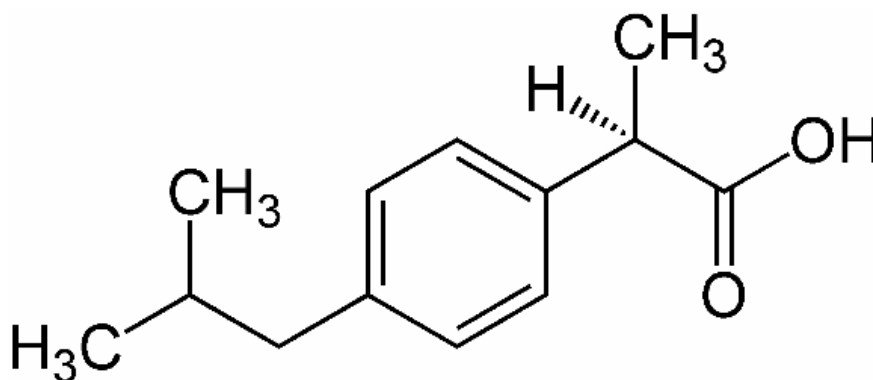
Kyselina (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová

Jedná se o bílý krystalický prášek. Snadno rozpustný v acetonu, etheru, methanolu a dichlor-methanu. Rozpouští se také ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitánů.

Kyselina (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová je účinnou látkou léčiva Ibuprofen, který patří do skupiny tzv. nesteroidních protizánětlivých léčiv.

Tab. 15: Fyzikálně-chemické vlastnosti kyseliny (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionové

Chemická látka	Kyselina (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová
Název léčiva	Ibuprofen
Sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Molární hmotnost	206,28 g/mol
Rozpustnost ve vodě (25 °C)	–
Teplota tání	75–78 °C



Obr. 24: Kyselina (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová (zdroj: cs.wikipedia.org)

■ Příprava zásobního roztoku kyseliny (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionové

Nejdříve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 g/l a postupným ředěním byly připraveny roztoky s rozsahem 25,0-125,0 mg/l v objemu 50 ml.

■ Příprava koncentrační řady

Na přípravu 50 ml zkoušených roztoků byly pro jednotlivé koncentrace pipetovány objemy, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 16: Objemy kyseliny (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionové pipetované pro přípravu koncentrační řady

<i>c</i> (mg/l) zkoušeného roztoku	<i>V</i> (ml) zásobního roztoku
25	0,313
50	0,625
60	0,750
75	0,938
100	1,250
125	1,563

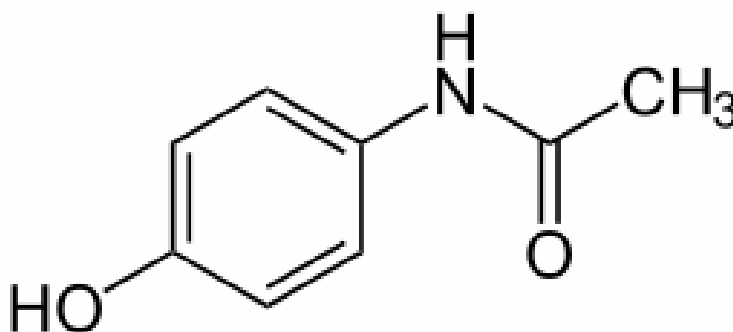
N-(4-hydroxyphenyl)acetamid

Jedná se bílý krystalický prášek, snadno rozpustný v methanolu a ethanolu, dobře rozpustný ve vodě.

N-(4-hydroxyphenyl)acetamid je účinnou látkou léčiva Paralen, který patří do skupiny analgetik, antipyretik.

Tab. 17: Fyzikálně-chemické vlastnosti N-(4-hydroxyphenyl)acetamidu

Chemická látka	N-(4-hydroxyphenyl)acetamid
Název léčiva	Paralen
Sumární vzorec	C ₈ H ₉ NO ₂
Molární hmotnost	151,18 g/mol
Rozpustnost ve vodě (25 °C)	14 g/l
Teplota tání	169–172 °C



Obr. 25: N-(4-hydroxyphenyl)acetamid (zdroj: cs.wikipedia.org)

■ Příprava zásobního roztoku N-(4-hydroxyphenyl)acetamidu

Nejdříve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 g/l a postupným ředěním byly připraveny roztoky s rozsahem 15,0-250,0 mg/l v objemu 50 ml.

■ Příprava koncentrační řady

Na přípravu 50 ml zkoušených roztoků byly pro jednotlivé koncentrace pipetovány objemy, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 18: Objemy 3,5-dichlorfenolu pipetované pro přípravu koncentrační řady

<i>c</i> (mg/l) zkoušeného roztoku	<i>V</i> (ml) zásobního roztoku
15	0,188
50	0,625
85	1,063
120	1,500
155	1,938
190	2,375
250	3,125

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci diplomové práce byla stanovena korelace mezi počtem buněk řas zkoušeného roztoku a jeho absorbancí při vlnové délce 683 nm. Pro ověření správnosti postupů a citlivosti organismu byly provedeny testy se standardními testovacími látkami. Pro anorganické sloučeniny to byl dichroman draselný, jako zástupce organických látek byl použit 3,5-dichlorfenol. Dále byla stanovena a zhodnocena ekotoxicita vybraných chemických látek pomocí řasových testů. Pro testování byl využíván druh sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus*.

Všechny testy byly provedeny v souladu s metodikou standardizovanou ČSN EN ISO 8692.

4.1 Stanovení počtu buněk řas

Sladkovodní řasa *Desmodesmus subspicatus*, která byla pro účely diplomové práce využívána, se může vyskytovat v podobě samostatných buněk nebo se sdružovat do cenobií po 4, či 8 (viz obr. 13 v teoretické části práce).

V našem případě se převážně vyskytovala v jednobuněčné formě, proto byly pod mikroskopem počítány jednotlivé buňky.

Pro počítání byla používána počítací komůrka Cyrus I. Vyšetřeno bylo vždy 8 řádků po 40 čtvercích. Počet buněk na jednotlivých řádcích byl sečten a tato hodnota dosazena do rovnice (6).

Příklad výpočtu hustoty zásobní kultury pro stanovení korelace.

$$X = \frac{19\,140 \cdot 1\,600}{0,02 \cdot 1 \cdot 320} = 4\,785\,000 \text{ buněk/1 ml}$$

Ze všech vypočítaných hodnot bylo zjištěno, že hustota zásobní kultury se pohybuje v rozmezí $4\,785\,000 \pm 107\,750$ buněk/1 ml.

4.2 Korelace

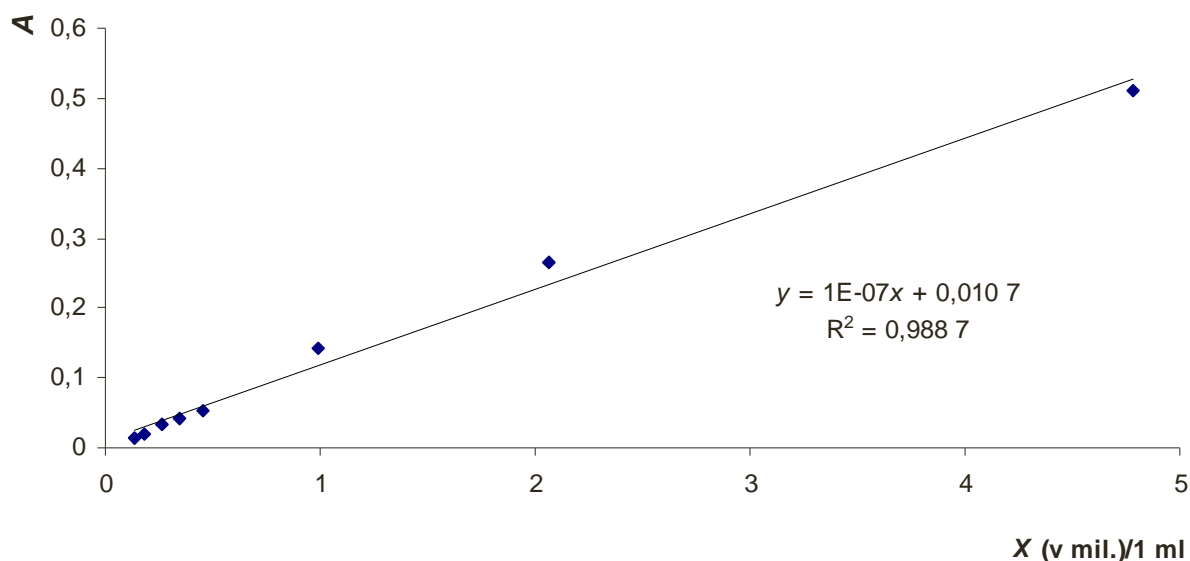
4.2.1 Stanovení počtu buněk řas v jednotlivých koncentracích

Ředěním zásobní kultury se připravila řada roztoků o známé koncentraci. Jednotlivé roztoky byly propočítány stejným způsobem jako zásobní kultura a byla proměřena jejich absorbance.

Tab. 19: Počet buněk řas v jednotlivých roztocích pro korelaci

Roztok	Navržená koncentrace	Spočítaná koncentrace	Absorbance
1	143 550	139 500	0,015
2	191 400	186 625	0,020
3	287 100	262 250	0,033
4	382 800	343 000	0,041
5	478 500	457 000	0,053
6	1 196 250	987 250	0,143
7	2 392 500	2 062 750	0,266
8	4 785 000	4 785 000	0,510

Z naměřených hodnot byla vynesena závislost počtu buněk na absorbanci řasové suspenze.



Graf 1: Závislost absorbance na počtu buněk řas v jednotlivých koncentracích

Určená regresní přímka vyjadřuje téměř 99% shodu všech hodnot teoreticky navržených a experimentálně zjištěných počtů buněk.

4.3 Řasový test se standardní testovací látkou $K_2Cr_2O_7$

4.3.1 Objem řasového inokula

Hustota zásobní kultury byla pomocí počítání s komůrkou Cyrus I pod mikroskopem stanovena na 3 501 499 buněk/1 ml. Zároveň bylo provedeno ověření platnosti korelace proměřením zásobní kultury spektrofotometrem.

Tab. 20: Porovnání spočítané hustoty řasové suspenze pod mikroskopem a teoretickým výpočtem

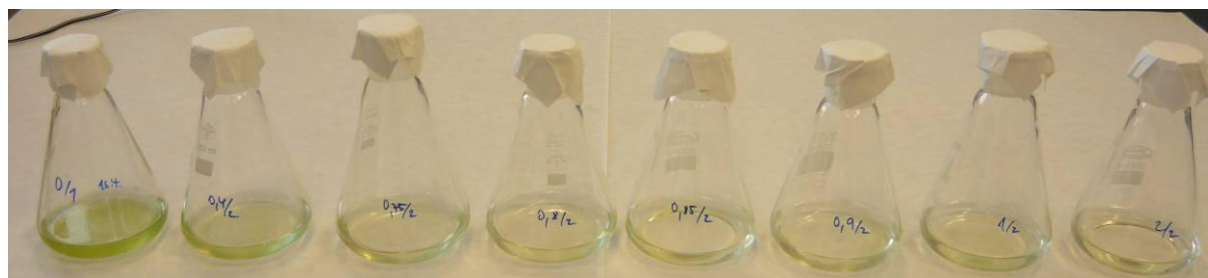
Roztok	Navržená hustota (počet buněk/1 ml)	Spočítaná hustota (počet buněk/1 ml)	Směrodatná odchylka
zásobní kultura	3 673 100	3 501 499	85 800

Z takto husté kultury by bylo pro účel testu pipetováno velmi malé množství, počet buněk v jednotlivých roztocích by se tak mohl značně lišit, proto byla tato zásobní kultura naředěna na hustotu přibližně 200 000 buněk/1 ml. Z této ředěné zásobní kultury bylo pro každý zkoušený roztok odebíráno 5 ml inokula.

Na spektrofotometru se proměřila absorbance jednotlivých roztoků, která byla zaznamenána jako nulová na začátku testu.

4.3.2 Vyhodnocení

Po 72 ± 2 hodinách bylo provedeno vyhodnocení testu měřením absorbancí jednotlivých roztoků a spočítáním buněk pomocí komůrky Cyrus I pod mikroskopem pro ověření platnosti korelace.



Obr. 26: Řasový test s $K_2Cr_2O_7$

Tab. 21: Dichroman draselný – zkoušená sada I

c (mg/l)	A	Ø počet buněk	X (počet buněk v 1 ml)	$\ln X$	μ (1/d)	I_μ (%)
0,000	0,191	7 248,000	1 812 000	14,410	0,045	–
0,400	0,092	3 192,500	798 125	13,590	0,033	25,540
0,750	0,052	1 64200	410 500	12,925	0,024	46,251
0,800	0,045	1 365,000	341 250	12,740	0,0214	52,006
0,850	0,042	1 217,500	304 375	12,626	0,020	55,565
0,900	0,039	1 127,500	281 875	12,549	0,019	57,960
1,000	0,034	934,000	233 500	12,361	0,016	63,825
2,000	0,020	366,000	91 500	11,424	0,003	93,007

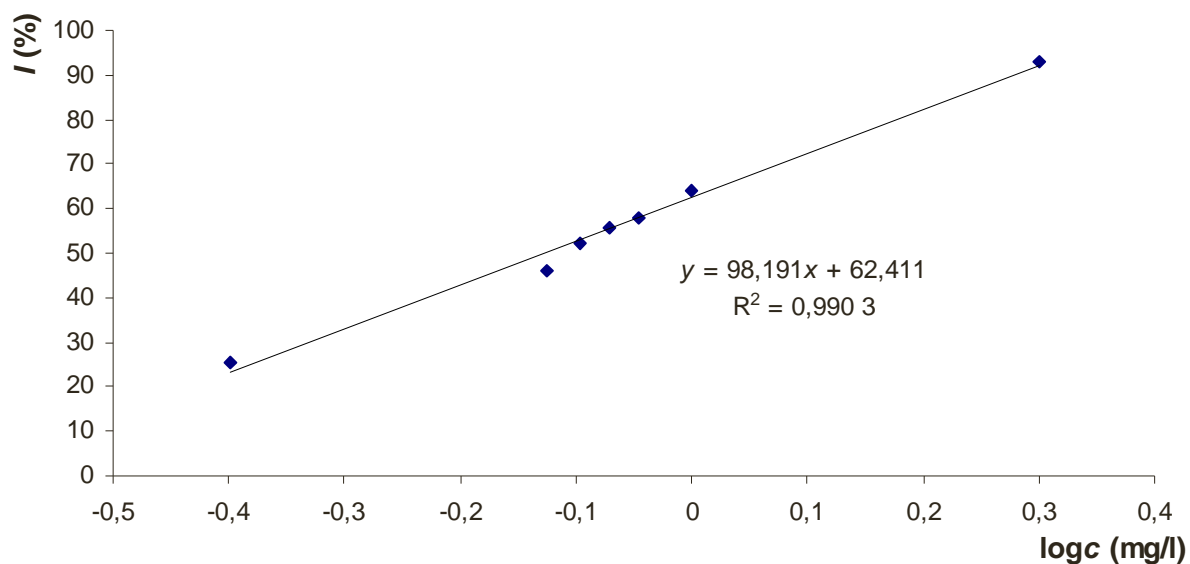
Tab. 22: Dichroman draselný – zkoušená sada II

c (mg/l)	A	Ø počet buněk	X (počet buněk v 1 ml)	$\ln X$	μ (1/d)	I_μ (%)
0,000	0,191	7 248,000	1 812 000	14,410	0,045	–
0,400	0,090	3 165,500	791 375	13,582	0,034	25,804
0,750	0,052	1 645,000	411 250	12,927	0,024	46,194
0,800	0,044	1 336,500	334 125	12,719	0,021	52,663
0,850	0,041	1 205,500	301 375	12,616	0,020	55,876
0,900	0,039	1 130,000	282 500	12,551	0,019	57,891
1,000	0,035	967,500	241 875	12,396	0,017	62,727
2,000	0,019	348,000	87 000	11,373	0,002	94,578

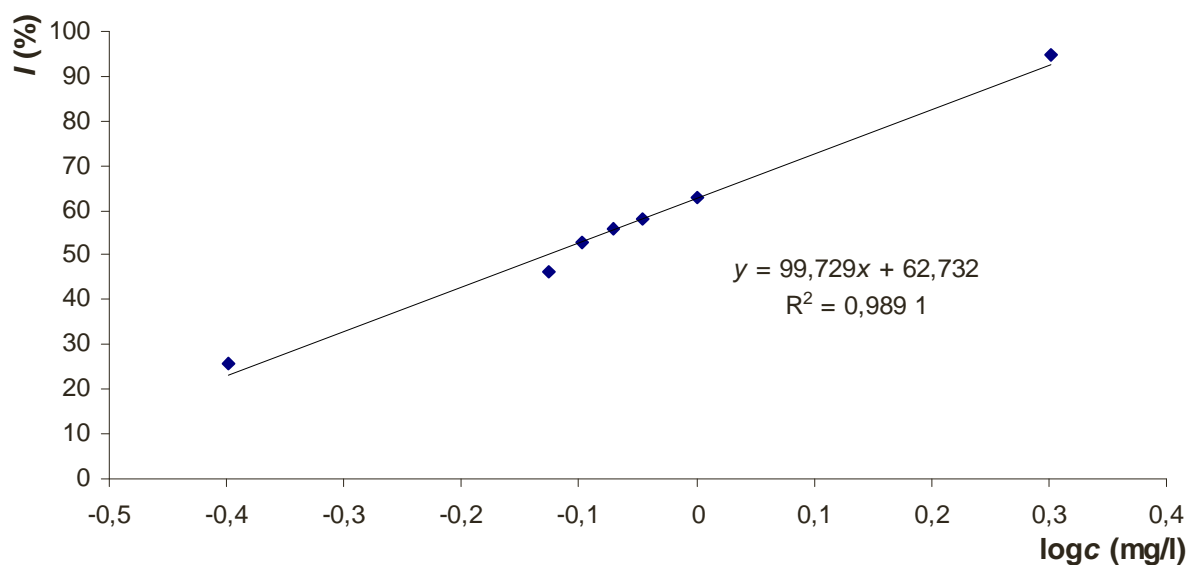
Porovnáním vypočítaných hustot buněk řasové suspenze a hodnot získaných teoretickým výpočtem z rovnice regresní přímky korelační křivky můžeme ověřit, že hustota buněk řasové suspenze koreluje s její absorbancí (viz tab. 23).

Tab. 23: Porovnání naměřené a vypočítané hustoty roztoků koncentrační řady

c (mg/l)	A	X vypočítaná (počet buněk v 1 ml)	X naměřená (počet buněk v 1 ml)	Směrodatná odchylka
0,000	0,191	1 803 100	1 812 000	4 450
0,400	0,090	793 100	791 375	862
0,750	0,052	413 100	411 250	925
0,800	0,044	333 100	334 125	512
0,850	0,041	303 100	301 375	862
0,900	0,039	283 100	282 500	300
1,000	0,035	243 100	241 875	612
2,000	0,019	83 100	87 000	1 950



Graf 2: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu I



Graf 3: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu II

Z rovnic regresních přímek závislosti inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku byly vypočteny hodnoty E_rC_{50} dichromanu draselného pro jednotlivé zkoušené sady.

Tab. 24: Určení E_rC_{50}

Zkoušená sada	$\log E_rC_{50}$	E_rC_{50} (mg/l)	Směrodatná odchylka
I	-0,126	0,747	0,001
II	-0,128	0,745	
Standardní hodnota	–	0,840	0,120

Z vypočítaných hodnot bylo zjištěno, že E_rC_{50} dichromanu draselného se pohybuje v rozmezí $0,75 \pm 0,00$ mg/l.

4.4 Řasový test se standardní testovací látkou 3,5-dichlorfenol

4.4.1 Objem řasového inokula

Hustota zásobní kultury byla pomocí spektrofotometru stanovena na 1 363 100 buněk/1 ml.

Tab. 25: Zjištění hustoty řasové kultury

Roztok	A	Hustota (počet buněk/1 ml)
zásobní kultura	0,147	1 363 100

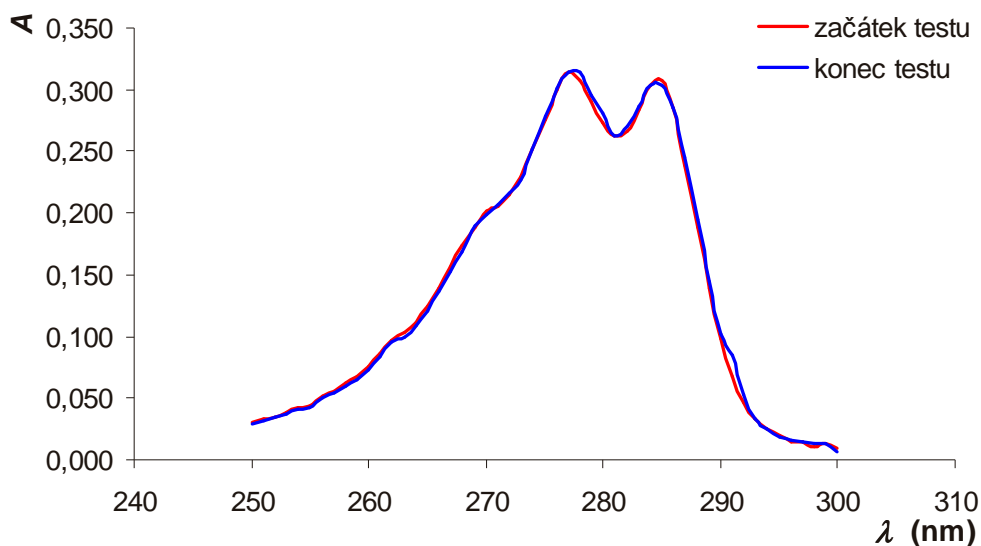
Z takto husté kultury by bylo pro účel testu pipetováno velmi malé množství, počet buněk v jednotlivých roztocích by se mohl značně lišit, proto byla tato zásobní kultura naředěna na hustotu přibližně 200 000 buněk/1 ml. Z takto ředěné zásobní kultury byly pro každý zkoušený roztok odebírány 3 ml inokula.

Na spektrofotometru se proměřila absorbance jednotlivých roztoků, která byla zaznamenána jako nulová na začátku testu.

4.4.2 Těkavost 3,5-dichlorfenolu (test)

Fenol a jeho deriváty jsou převážně těkavé látky, proto byl proveden tento jednoduchý test pro ověření, že ve zkušebních roztocích zůstanou takové koncentrace, jaké byly pro test určeny.

Porovnáním absorpčních maxim v UV oblasti spektra před začátkem a na konci testu bylo zjištěno, že 3,5-dichlorfenol je na vzduchu při laboratorní teplotě (23 °C) stálý. Tento jev dokumentuje obr. 27, z kterého je patrné, že nedošlo k posunu absorpčního spektra ani ke změně absorbance a absorpčního maxima.



Obr. 27: Porovnání absorbčních spekter 3,5-dichlorofenolu před a po ukončení testu

4.4.3 Vyhodnocení

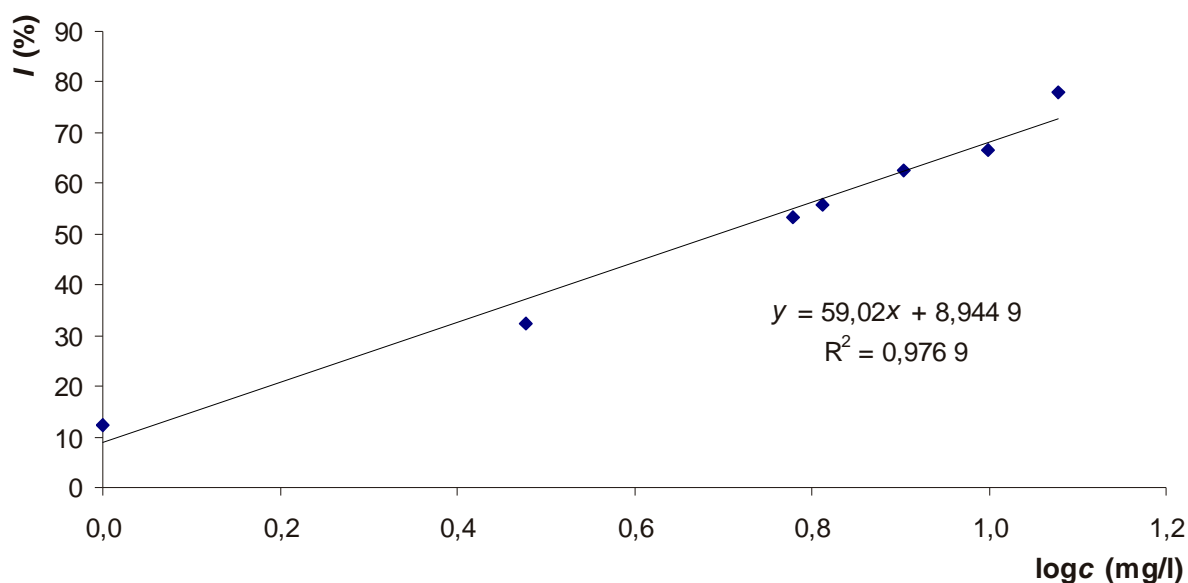
Po 72 ± 2 hodinách bylo provedeno vyhodnocení testu měřením absorbancí jednotlivých roztoků.

Tab. 26: 3,5-dichlorfenol – zkoušená sada I

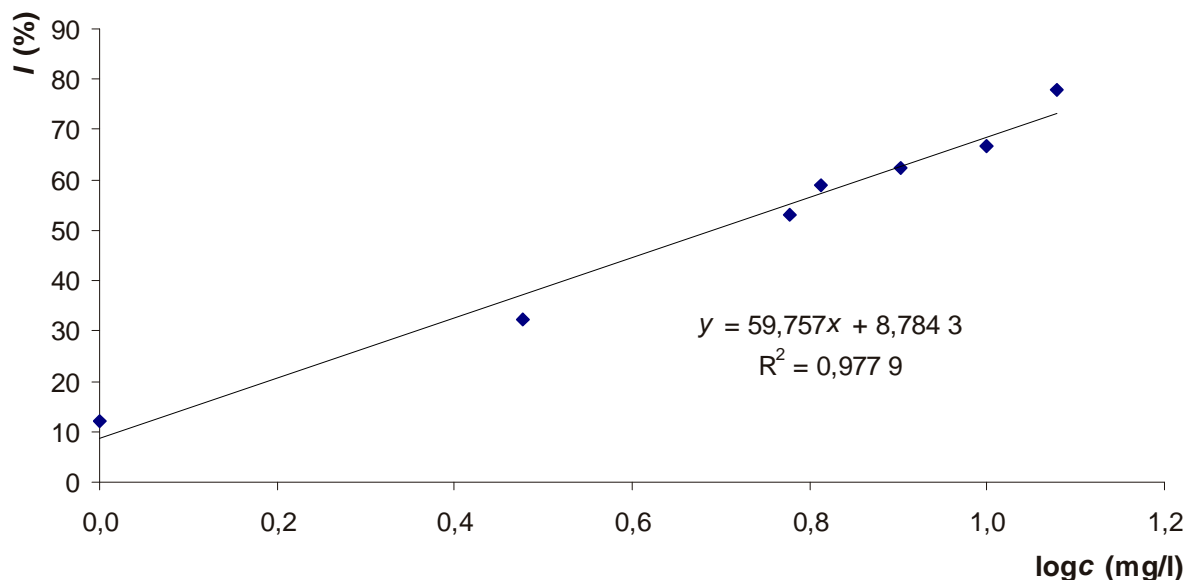
c (mg/l)	A	X (počet buněk v 1 ml)	$\ln X$	μ (1/d)	I_{μ} (%)
0,000	0,097	863 100	13,668	0,058	–
1,000	0,062	513 100	13,148	0,051	12,418
3,000	0,033	223 100	12,315	0,039	32,305
6,000	0,020	93 100	11,441	0,027	53,173
6,500	0,019	83 100	11,329	0,025	55,887
8,000	0,017	63 100	11,052	0,022	62,461
10,000	0,016	53 100	10,880	0,019	66,581
12,000	0,014	33 100	10,407	0,013	77,867

Tab. 27: 3,5-dichlorfenol – zkoušená sada II

c (mg/l)	A	X (počet buněk v 1 ml)	$\ln X$	μ (1/d)	I_{μ} (%)
0,000	0,097	863 100	13,668	0,058	–
1,000	0,063	523 100	13,168	0,051	11,957
3,000	0,033	223 100	12,315	0,039	32,305
6,000	0,020	93 100	11,441	0,027	53,173
6,500	0,018	73 100	11,200	0,024	58,948
8,000	0,017	63 100	11,052	0,022	62,461
10,000	0,016	53 100	10,880	0,019	66,581
12,000	0,014	33 100	10,407	0,014	77,867



Graf 4: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu I



Graf 5: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu II

Z rovnic regresních přímek závislosti inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku jednotlivých zkoušených sad byla vypočtena hodnota $E_r C_{50}$ pro 3,5-dichlorfenol.

Tab. 28: Určení $E_r C_{50}$

Zkoušená sada	$\log E_r C_{50}$	$E_r C_{50}$ (mg/l)	Směrodatná odchylka
I	0,696	4,965	0,035
II	0,690	4,896	
standardní hodnota		6,420	2,380

Z vypočítaných hodnot bylo zjištěno, že $E_r C_{50}$ 3,5-dichlorfenolu se pohybuje v rozmezí $4,93 \pm 0,03$ mg/l.

4.5 Test s kyselinou 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octovou

4.5.1 Objem řasového inokula

Hustota zásobní kultury byla pomocí spektrofotometru stanovena na 943 100 buněk/1 ml.

Tab. 29: Zjištění hustoty řasové kultury

Roztok	A	Hustota (počet buněk/1 ml)
zásobní kultura	0,105	943 100

Pro test byly pipetovány 2 ml inokula.

4.5.2 Vyhodnocení

Po 72 ± 2 hodinách bylo provedeno vyhodnocení testu měřením absorbancí jednotlivých roztoků.

Byl připraven slepý vzorek řasového inokula s přidavkem methanolu, ve kterém bylo léčivo rozpuštěno, pro vyloučení jeho ekotoxicity. Porovnáním absorbancí kontrolního a slepého vzorku bylo zjištěno, že samotné rozpouštědlo nezpůsobuje inhibici růstu řasového inokula.

Tab. 30: Porovnání absorbancí kontrolního a slepého vzoru s methanolem

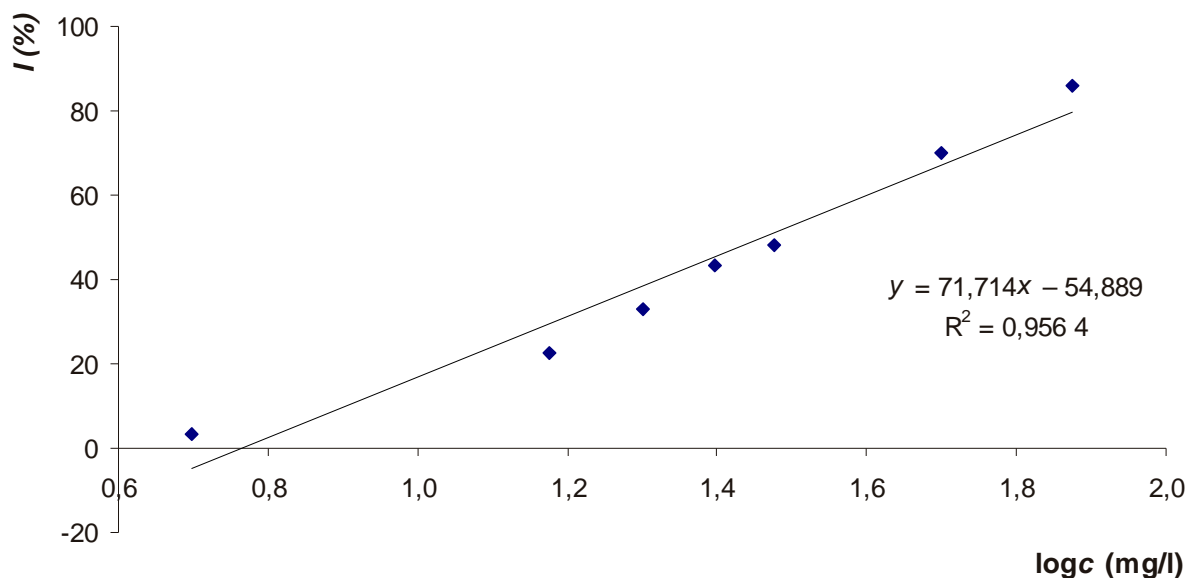
	Kontrolní vzorek	Slepý vzorek s methanolem
A	0,206	0,212
X (počet buněk/1 ml)	1 953 100	2 013 100

Tab. 31: Kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová – zkoušená sada I

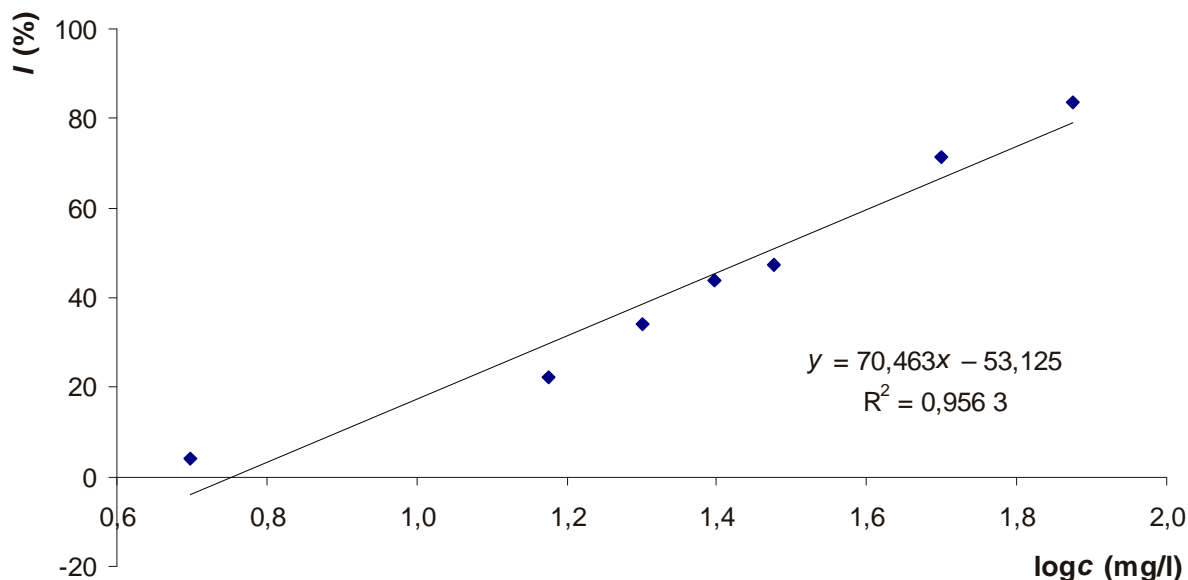
c (mg/l)	A	X (počet buněk v 1 ml)	lnX	μ (1/d)	I $_{\mu}$ (%)
0	0,206	1 953 100	14,482	0,041	–
5	0,187	1 763 100	14,383	0,041	3,363
15	0,109	983 100	13,798	0,033	22,555
20	0,082	713 100	13,477	0,028	33,105
25	0,063	523 100	13,168	0,0240	43,286
30	0,056	453 100	13,024	0,022	48,006
50	0,034	233 100	12,359	0,013	69,844
75	0,025	143 100	11,871	0,006	85,876

Tab. 32: Kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová – zkoušená sada II

c (mg/l)	A	X (počet buněk v 1 ml)	lnX	μ (1/d)	I $_{\mu}$ (%)
0	0,206	1 953 100	14,485	0,041	–
5	0,184	1 733 100	14,366	0,041	3,927
15	0,110	993 100	13,809	0,033	22,223
20	0,080	693 100	13,449	0,028	34,040
25	0,062	513 100	13,148	0,024	43,920
30	0,057	463 100	13,046	0,022	47,289
50	0,033	223 100	12,315	0,012	71,288
75	0,026	153 100	11,939	0,007	83,656



Graf 6: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu I



Graf 7: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu II

Z rovnic regresních přímek závislosti inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku jednotlivých zkoušených sad byla vypočítaná hodnota E_rC_{50} kyseliny 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octové.

Tab. 33: Určení E_rC_{50}

Zkoušená sada	$\log E_rC_{50}$	E_rC_{50} (mg/l)	Směrodatná odchylka
I	1,481	30,283	0,605
II	1,464	29,074	

Z vypočítaných hodnot bylo zjištěno, že E_rC_{50} kyseliny 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octové se pohybuje v rozmezí $29,68 \pm 0,60$ mg/l.

4.6 Test s kyselinou (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionovou

4.6.1 Objem řasového inokula

Hustota zásobní kultury byla pomocí spektrofotometru stanovena na 943 100 buněk/1 ml.

Tab. 34: Zjištění hustoty řasové kultury

Roztok	A	Hustota (počet buněk/1 ml)
zásobní kultura	0,105	943 100

Pro test byly pipetovány 2 ml inokula.

4.6.2 Vyhodnocení

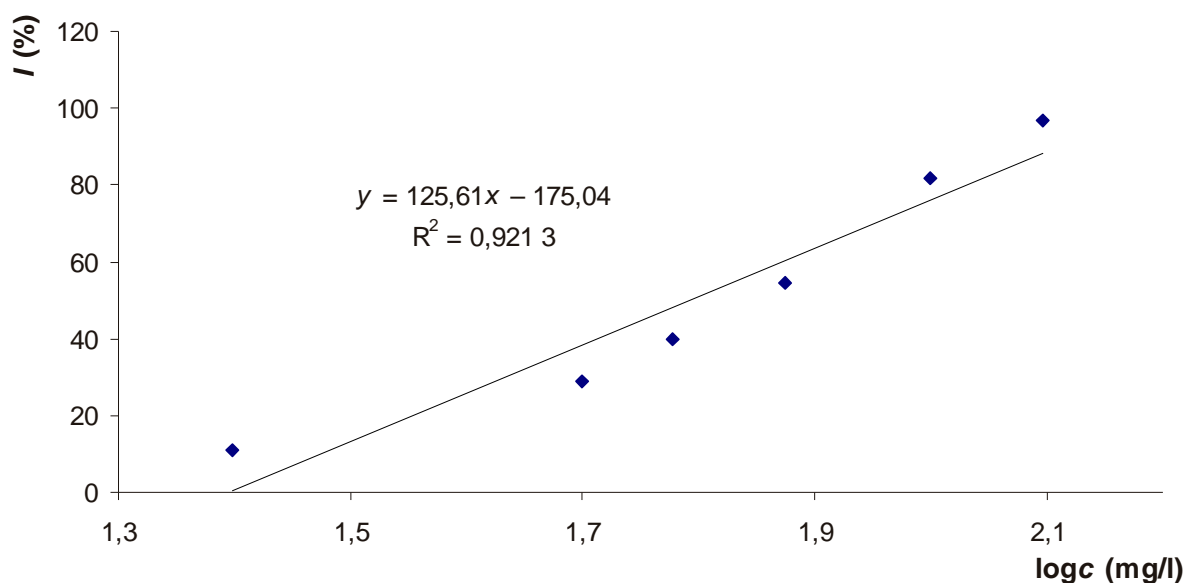
Po 72 ± 2 hodinách bylo provedeno vyhodnocení testu měřením absorbancí jednotlivých roztoků.

Tab. 35: Kyselina (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová – zkoušená sada I

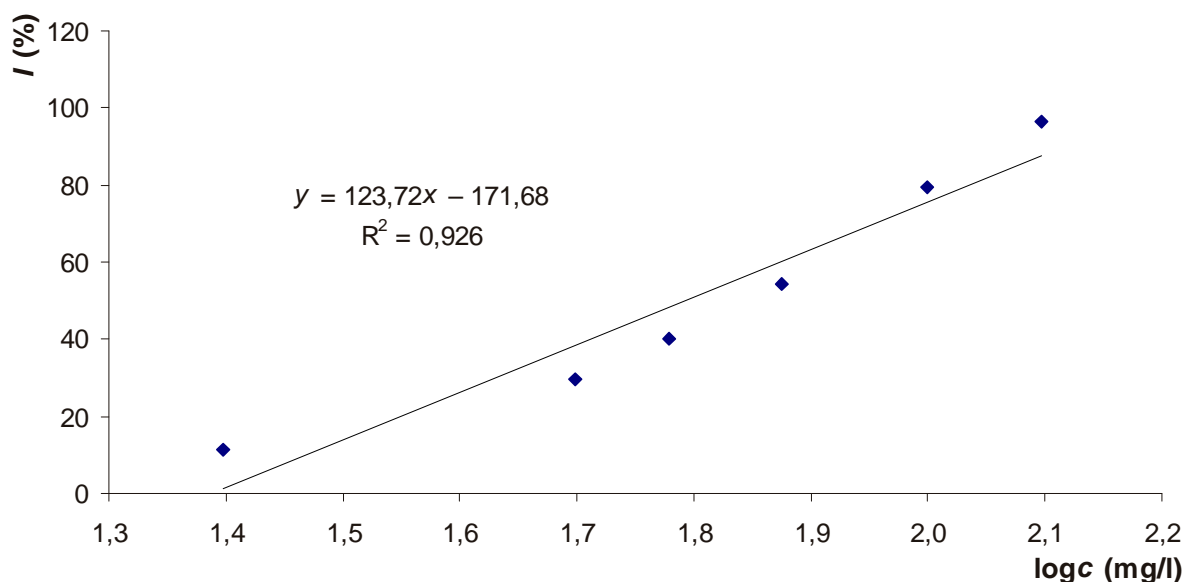
c (mg/l)	A	X (počet buněk v 1 ml)	lnX	μ (1/d)	I_{μ} (%)
0	0,206	1 953 100	14,485	0,042	–
25	0,150	1 393 100	14,148	0,038	11,102
50	0,092	813 100	13,609	0,030	28,793
60	0,069	583 100	13,276	0,025	39,718
75	0,048	373 100	12,830	0,019	54,389
100	0,027	163 100	12,002	0,008	81,577
125	0,021	103 100	11,544	0,001	96,648

Tab. 36: Kyselina (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová – zkoušená sada II

c (mg/l)	A	X (počet buněk v 1 ml)	lnX	μ (1/d)	I_{μ} (%)
0	0,206	1 953 100	14,485	0,042	–
25	0,149	1 383 100	14,140	0,037	11,339
50	0,090	793 100	13,583	0,030	29,611
60	0,068	573 100	13,259	0,025	40,286
75	0,048	373 100	12,830	0,019	54,389
100	0,028	173 100	12,062	0,009	79,622
125	0,021	103 100	11,544	0,001	96,648



Graf 8: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu I



Graf 9: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu II

Z rovnic regresních přímek závislosti inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku jednotlivých zkoušených sad byla vypočtena hodnota E_rC_{50} kyseliny (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionové.

Tab. 37: Určení E_rC_{50}

Zkoušená sada	$\log E_rC_{50}$	E_rC_{50} (mg/l)	Směrodatná odchylka
I	1,794	62,287	0,186
II	1,792	61,916	

Z vypočítaných hodnot bylo zjištěno, že E_rC_{50} kyseliny (RS)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionové se pohybuje v rozmezí $62,10 \pm 0,19$ mg/l.

4.7 Test s N-(4-hydroxyphenyl)acetamidem

4.7.1 Objem řasového inokula

Hustota zásobní kultury byla pomocí spektrofotometru stanovena na 943 100 buněk/1 ml.

Tab. 38: Zjištění hustoty řasové kultury

Roztok	A	Hustota (počet buněk/1 ml)
zásobní kultura	0,105	943 100

Pro test byly pipetovány 2 ml inokula.

4.7.2 Vyhodnocení

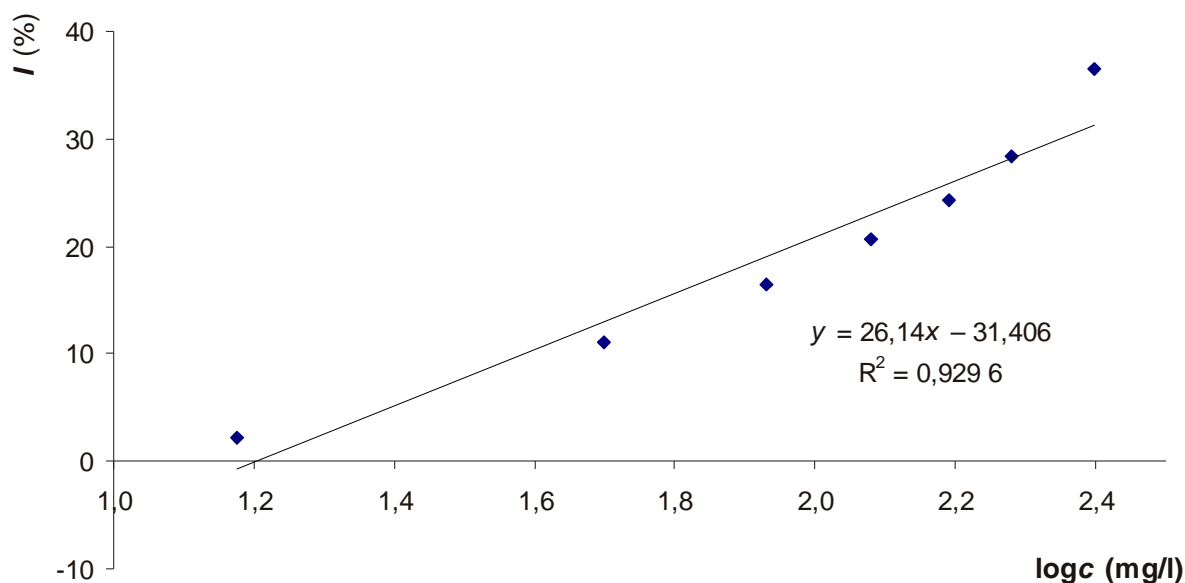
Po 72 ± 2 hodinách bylo provedeno vyhodnocení testu měřením absorbancí jednotlivých roztoků.

Tab. 39: N-(4-hydroxyphenyl)acetamid – zkoušená sada I

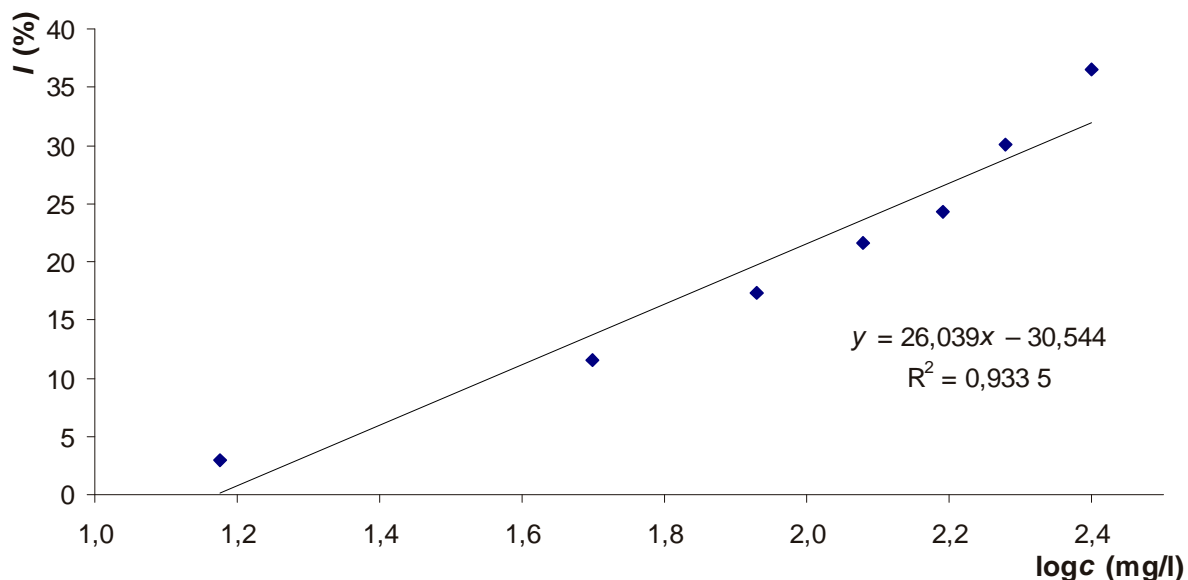
c (mg/l)	A	X (počet buněk v 1 ml)	lnX	μ (1/d)	I $_{\mu}$ (%)
0	0,206	1 953 100	14,485	0,042	–
15	0,193	1 823 100	14,416	0,041	2,263
50	0,150	1 393 100	14,147	0,038	11,102
85	0,129	1 183 100	13,984	0,035	16,471
120	0,115	1 043 100	13,858	0,034	20,609
155	0,104	933 100	13,746	0,032	24,270
190	0,093	823 100	13,621	0,030	28,392
250	0,075	643 100	13,374	0,027	36,450

Tab. 40: N-(4-hydroxyphenyl)acetamid – zkoušená sada II

c (mg/l)	A	X (počet buněk v 1 ml)	lnX	μ (1/d)	I $_{\mu}$ (%)
0	0,206	1 953 100	14,485	0,042	–
15	0,189	1 783 100	14,394	0,041	2,992
50	0,148	1 373 100	14,133	0,037	11,577
85	0,126	1 153 100	13,958	0,035	17,314
120	0,112	1 013 100	13,829	0,033	21,567
155	0,104	933 100	13,746	0,032	24,270
190	0,089	783 100	13,571	0,030	30,028
250	0,075	643 100	13,374	0,027	36,450



Graf 10: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu I



Graf 11: Závislost inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku pro sadu II

Z rovnic regresních přímek závislosti inhibice růstu řasového inokula na koncentraci zkoušeného vzorku jednotlivých zkoušených sad byla vypočtena hodnota $E_r C_{25}$ N-(4-hydroxyphenyl)acetamidu.

Tab. 41: Určení $E_r C_{25}$

Zkoušená sada	$\log E_r C_{25}$	$E_r C_{25}$ (mg/l)	Směrodatná odchylka
I	2,158	143,880	4,024
II	2,133	135,831	

Z vypočítaných hodnot bylo zjištěno, že $E_r C_{25}$ N-(4-hydroxyphenyl)acetamidu se pohybuje v rozmezí $139,86 \pm 4,02$ mg/l.

5. ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala využitím řasových testů k hodnocení ekotoxicity vybraných chemických látek: kyseliny 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octové, kyseliny (*RS*)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionové a N-(4-hydroxyphenyl)acetamidu. Metodika zkoušky inhibice růstu sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus*, která byla k hodnocení využívána, je standardizována ČSN EN ISO 8692.

Tato metoda je náročná nejen na preciznost provedení, ale zejména podstatou samotného vyhodnocení testu počítáním řasových buněk pomocí mikroskopu. Za účelem zjednodušení testu a zrychlení vyhodnocování byla vypracována korelační křivka, vyjadřující závislost absorbance řasové suspenze na počtu buněk řas. Hodnoty experimentálně zjištěných koncentrací roztoků řasových suspenzí byly v téměř 99% shodě s koncentracemi navrženými teoretickým výpočtem.

Vhodnost a správnost metody byla ověřena vyhodnocením E_rC_{50} standardních chemických látek dichromanu draselného a 3,5-dichlorfenolu.

Hodnota E_rC_{50} dichromanu draselného byla stanovena na $0,75 \pm 0,00$ mg/l, tato hodnota spadá do intervalu spolehlivosti $<0,72; 0,96>$ mg/l udávaného ČSN EN ISO 8692. Hodnota E_rC_{50} 3,5-dichlorfenolu byla stanovena na $4,93 \pm 0,03$ mg/l a rovněž spadá do intervalu spolehlivosti $<4,04; 8,80>$ mg/l udávaného ČSN EN ISO 8692.

Z testovaných chemických látek vykazovala nejvyšší ekotoxicitu kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová. Hodnota E_rC_{50} byla stanovena na $29,68 \pm 0,60$ mg/l. Jako méně ekotoxická se jevila kyselina (*RS*)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová, jejíž hodnota E_rC_{50} byla stanovena na $62,10 \pm 0,19$ mg/l. Pro N-(4-hydroxyphenyl)acetamid nebylo možno hodnotu E_rC_{50} stanovit, jelikož ani u nejvyšší testované koncentrace 250 mg/l nepřesáhla inhibice 50 %. Proto byla vyhodnocena alespoň hodnota E_rC_{25} , která se pohybuje v rozmezí $139,86 \pm 4,02$ mg/l.

Přestože E_rC_{50} N-(4-hydroxyphenyl)acetamidu nebyla stanovena, lze porovnáním výsledků konstatovat, že N-(4-hydroxyphenyl)acetamid představuje z ekotoxikologického hlediska pro životní prostředí výrazně menší nebezpečí než kyselina 2-[2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl]octová a kyselina (*RS*)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propionová.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. AMBROŽOVÁ, J. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd. Praha : VŠCHT, 2003. 226 s. ISBN 80-7080-521-8.
2. BLAISE, CH. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006, vol. 6, is. 2, p. 145–155.
3. BOZEMAN, J.; KOOPMAN, B.; BITTON, G. Toxicity testing using immobilized algae. *Aquatic Toxicology*. 1989, vol. 14, is. 4, p. 345–352.
4. CEPÁK, V. O.; PŘIBYL, P.; KNOPP, K. CCALA – Culture Collection of the Centre of Algology [online]. 2010 [cit. 2010-05-07]. Media. Dostupné z WWW: <<http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php>>.
5. CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 2002, vol 142, is. 3, p. 185–194.
6. ČSN 75 7712. *Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu*. Praha : Český normalizační institut, 2005. 16 s.
7. ČSN EN ISO 8692. *Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas*. Praha : Český normalizační institut, 2005. 20 s.
8. ČSN EN ISO/IEC 17025. *Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří*. Praha : Český normalizační institut, 2005. 48 s.
9. DUFFUS, J. H.; WORTH, H. G. J. (eds.) *Fundamental Toxicology for Chemists*. 1st ed. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 1996. 327 p. ISBN 0-85404-529-5.
10. EMPLA AG spol. s r. o. / *Ochrana Životní prostředí* [online]. 2010 [cit. 2010-05-08]. Ekotoxikologické testy. Dostupné z WWW: <<http://www.empla.cz/ekotoxikologicke-testy/>>.
11. EU. Nařízení Komise (ES) č. 761/2009. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2009, L 220, s. 1–94.
12. FERRARI, B.; et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, vol. 55, is. 3, p. 359–370.
13. FLETCHER, J. S. *Plants for toxicity assessment*. Philadelphia : ASTM, 1990. Use of algae versus vascular plants to test for chemical toxicity, p. 33–39. ISBN 0-8031-1397-8.
14. GIESY, J. P.; HOKE, R. A. *Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants*. Boca Raton : CRC Press, 1990. Freshwater sediment quality criteria: Toxicity Bioassessment, p. 265–348. ISBN 0-87371-252-8.
15. HAUSER, V. *Biotest*. [online]. [cit. 2010-05-07]. Dostupné z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/popis_rasy_rostliny_okrehek.pdf>.
16. HOFFMAN, D. J.; et al. (eds). *Handbook of Ecotoxicology*. 2nd ed. Boca Raton : CRC Press, 2003. 1 290 p. ISBN 978-1-56670-546-2.

17. CHOVANEC, P. *Význam řasových testů v hodnocení ekotoxicity*. Brno : FCh VUT v Brně, 2009. 33 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.
18. *Katedra ekologie a ŽP* [online]. 2009 [cit. 2010-05-05]. Ekotoxikologie. Dostupné z WWW: <<http://ekologie.upol.cz/ku/ahdo/EKOTOX.DOC>>.
19. KOČÍ, V. Ekotoxikologie – nauka o účincích toxických látek na životní prostředí. In *Sborník z Podzimní školy Astra*. Praha : VŠCHT, 2003 [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: <<http://teacher.vscht.cz/dokumenty/download/sbornik2003.pdf>>.
20. KOČÍ, V.; MLEJNEK, M. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 2003 [cit. 2010-05-08]. Řasový mikrobiotest. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/mikrometodaras.htm>>.
21. KOČÍ, V.; MLEJNEK, M.; BURKHARD, J. Statistické vyhodnocování řasových testů. *Czech Phycology* [online]. 2002, vol. 2, is. 2, [cit. 2010-05-08]. Dostupný z WWW: <http://fottea.czechphycology.cz/_contents/CP2-2002-17.pdf>.
22. KOČÍ, V.; RAKOVICKÝ, T.; ŠVAGR, A. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 2001 [cit. 2010-05-08]. Testy akutní a semichronické toxicity. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Obecna.htm#_Toc525629228>.
23. MARŠÁLEK, B. *Ekotoxikologické biotesty : rozdělení, přehled, použití* [online]. Brno, 2006. 38 s. Přednáška. Masarykova univerzita, RECETOX. Dostupné z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_prezentace/Rozdeleni_EB.pdf>.
24. MARŠÁLEK, B. *Mikrobiotesty : Druhá generace ekotoxikologických biotestů* [online]. Brno, 2006. 42 s. Dostupné z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/Prehled_mikrobiotestu.pdf>.
25. MARŠÁLEK, B.; LUKAVSKÝ, J. *Řasové testy trofie a toxicity* [online]. [cit. 2010-05-07]. Dostupné z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/RasoveTestyPrehled.pdf>.
26. MAXAM, G.; et al. Use of Bioassays for Assessment of Water-Extractable Ecotoxic Potential of Soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000, vol. 45, is. 3, p. 240–246.
27. MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, vol. 59, is. 2, p. 164–173.
28. NEWMAN, M. C.; UNGER, M. A. *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2nd ed. Boca Raton : CRC Press, 2003. 458 s. ISBN 1-56670-598-3.
29. PALEČEK, J.; HORÁK, J.; LINHART, I. *Toxikologie a bezpečnost práce v chemii*. Praha : VŠCHT, 1999. 189 s.
30. PATOČKA, J.; aj. *Vojenská toxikologie*. Praha : Grada Publishing, 2004. 180 s. ISBN 80-247-0608-3.

31. PAYNE, A. G.; HALL, R. H. *Aquatic Toxicology*. Baltimore : ASTM, 1990. Method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals, p. 171–180.
32. PETERS, C.; et al. A Marine Bioassay Test Set to Assess Marine Water and Sediment Quality—its Need, the Approach and First Results. *Ecotoxicology*. 2002, vol. 11, is. 5, p. 379–383. ISSN 0963-9292.
33. PICKA, K.; MATOUŠEK, J. *Základy obecné a speciální toxikologie*. Praha : Ministerstvo životního prostředí ČR, 1996. 102 s. ISBN 80-85368-91-9.
34. POULÍČKOVÁ, A.; JURČÁK, J. *Malý obrazový atlas našich sinic a řas*. 1. vyd. Olomouc : Univerzita Palackého, 2001. ISBN 80-244-0242-4.
35. Přírodovědecká fakulta JU. www.sinicearasy.cz [online]. c2003 [cit. 2010-05-07]. Skriptá pro velkou fykologii (KBO134). Dostupné z WWW: <<http://www.sinicearasy.cz/134/uvod>>.
36. ROJÍČKOVÁ, R. *Alternativní testy toxicity* [online]. Brno, 2006. 14 s. Přednáška. Masarykova univerzita, RECETOX. Dostupné z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/mikrobiotesty.pdf>.
37. ROJÍČKOVÁ, R.; DVOŘÁKOVÁ, D.; MARŠÁLEK, B. The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the standard flask assay. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 1998, vol. 13, is. 3, p. 235–241.
38. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Vydavatelství VŠCHT Praha* [online]. Verze 1.0. 2007 [cit. 2010-05-07]. Jana Ambrožová: Encyklopedie hydrobiologie. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/>.
39. SANDERSON, H.; THOMSEN, M. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. *Toxicology Letters*. 2009, vol. 68, is. 1, p. 1–10.
40. SLÁDEČKOVÁ, A.; SLÁDEČEK, V. *Hydrobiologie*. 1. vyd. Praha : České vysoké učení technické, 1995. 141 s. isbn 80-01-01298-0.
41. STACE, C. A. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2nd ed. Cambridge : University Press, 1991. 272 p.
42. SVOBODOVÁ, Z. *Ekotoxikologie : praktická cvičení. Část I, Testy toxicity na organizmech vodního prostředí*. 1. vyd. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita, 2000. 70 s. ISBN 80-85114-95-X.
43. ŠTĚPÁNKOVÁ, I. *Posouzení vhodnosti řasových testů pro hodnocení ekotoxicity látek*. Brno : FCh VUT v Brně, 2009. 57 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.
44. *Toxicita* [online]. Přednáška. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství. Brno, 2006. 54 s. Dostupné z WWW: <http://web2.mendelu.cz/af_224_rybari/dok%20rybari/toxicita.pdf>.

45. Univerzita Karlova v Praze. *Studijní informační systém* [online]. c2010 [cit. 2010-05-04]. Předměty. Dostupné z WWW:
<<http://is.cuni.cz/studium/predmety/index.php?do=predmet&kod=MC230P59>>.
46. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. *ČSN online pro jednotlivé uživatele* [online]. Verze 3.3. c2009 [cit. 2010-05-08]. Dostupné z WWW:
<<http://csnonline.unmz.cz/default.aspx>>.
47. *Vliv životního prostředí na bezpečnost potravin*. Brno : VFU, 2008. 50 s.
48. VŠCHT v Praze, Ústav chemie ochrany prostředí. *Obecná pravidla testování* [online]. [cit. 2010-05-07]. Dostupné z WWW:
<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox-Labo/CZverze/11_%20testovani.pdf>.
49. VŠCHT v Praze, Ústav chemie ochrany prostředí, Laboratoř ekotoxikologie a LCA. *Řasový test toxicity* [online]. [cit. 2010-05-07]. Dostupné z WWW:
<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox-Labo/CZverze/02_rasy.pdf>.
50. WALSH , G. E.; DEANS, Ch. H.; MCLAUGHLIN, L. L. Comparison of the EC50s of algal toxicity tests calculated by four methods. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1987, vol. 6, is. 10, p. 767–770.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$\bar{}$	průměrný
72hEC ₅₀	EC ₅₀ stanovená z testu trvajícího 72 hodiny
<i>A</i>	absorbance
<i>a</i>	počet jedinců nebo buněk v <i>n</i> čtvercích
<i>A_c</i>	průměrná plocha pro kontrolní vzorek (nulová koncentrace toxikantu)
<i>A_i</i>	plocha pod růstovou křivkou pro danou koncentraci; průměrná plocha pro danou koncentraci
<i>c</i>	koncentrace inokula (počet buněk/1 ml); koncentrace vzorku (mg/l)
ČOV	čistírna odpadních vod
ČSN	označení českých technických norem
EC ₅₀	střední efektivní koncentrace (half maximal Effective Concentration)
EEC	Evropské hospodářské společenství (European Economic Community)
EN	označení evropských norem
E _r C	EC stanovená z růstové koncentrace
E _r C ₂₅	efektivní koncentrace 25 % stanovená z růstové rychlosti
E _r C ₅₀	EC ₅₀ stanovená z růstové rychlosti
E _y C	EC stanovená z výtěžku
<i>i</i>	<i>i</i> -tý člen
IC ₅₀	inhibiční koncentrace 50 % (Inhibition Concentration 50 %)
<i>I_i</i>	inhibice nárůstu řas pro danou koncentraci toxikantu
<i>I_μ</i>	inhibice v %
<i>I_{μi}</i>	inhibice v procentech (růstová rychlost) pro zkoušenou koncentraci <i>i</i>
ISO	International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)
<i>K</i>	celkový počet čtverců v komůrce
<i>k</i>	koefficient pro přepočet organismů
λ	vlnová délka
LC ₅₀	letální koncentrace 50 % (Lethal Concentration 50 %)
LD ₅₀	letální dávka 50 % (Letal Dose 50 %)
LOEC	nejnižší pozorovatelná účinná koncentrace
μ	specifická růstová rychlost
μ_c	střední růstová rychlost u kontrolního vzorku
μ_i	střední růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci <i>i</i>
MŽP	Ministerstvo životního prostředí

n	počet volených koncentrací; počet vyšetřených čtverců
N_0	jmenovitá počáteční hustota buněk (počet buněk v 1 ml)
N_1	změřená hustota buněk v čase t_1 (počet buněk v 1 ml)
N_n	změřená hustota buněk v čase t_n (počet buněk v 1 ml)
NOEC	koncentrace bez pozorovatelných účinků
OC ₀	nejvyšší koncentrace látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci organismů
OC ₁₀₀	nejnižší koncentrace působící letálně
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
t_0	doba začátku testu
t_1	doba prvního měření od počátku testu v hodinách
t_L	doba ukončení testu
t_n	doba n -tého měření od počátku testu v hodinách
UV	ultrafialový (UltraViolet)
V	objem
VIS	viditelné spektrum
X	počet buněk v 1 ml
x_0	jmenovitá počáteční hustota buněk
x_L	hustota buněk měřená v době t_L
z	zahuštění vzorku